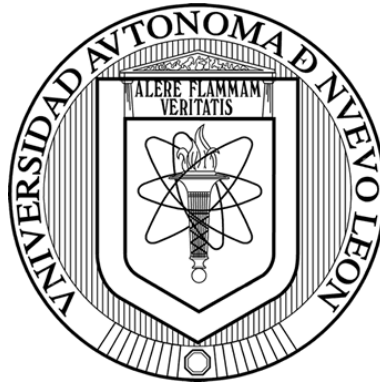


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD ANTI-ROTAVIRUS DE EXTRACTOS DE PLANTAS ACUOSOS E
HIDRO-ETANÓLICOS Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
VIRALES NSP2, NSP5 E INTERFERON- β

Por

C.D JUAN JOSÉ MARTÍNEZ SANMIGUEL.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestro En Ciencias Con Orientación en Inmunobiología

ACTIVIDAD ANTI-ROTAVIRUS DE EXTRACTOS DE PLANTAS ACUOSOS E
HIDRO-ETANÓLICOS Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN LOS GENES
VIRALES NSP2, NSP5 E INTERFERON- β

COMITÉ DE TESIS

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
PRESIDENTE

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
SECRETARIO

Dr. José Santos García Alvarado
Primer VOCAL

Dra. Licet Villareal Treviño
Segundo VOCAL

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Tercer VOCAL

ACTIVIDAD ANTI-ROTAVIRUS DE EXTRACTOS DE PLANTAS ACUOSOS E
HIDRO-ETANÓLICOS Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN LOS GENES
VIRALES NSP2, NSP5 E INTERFERON- β

Dirección de Tesis

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su matrícula.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Especialmente a la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindar el apoyo necesario para realizar este trabajo.

Un agradecimiento muy especial por las oportunidades brindadas, a mi asesor de tesis, Dr. Juan Francisco Contreras Cordero. Su motivación, su esfuerzo, dedicación, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y paciencia han sido fundamentales para mi formación.

A mi comité de tesis Dr. Carlos Hernández Luna, Dra. Licet Villareal Treviño, Dr. José Santos García, Dra. Norma L. Heredia Rojas, les agradezco por su colaboración para la culminación de este trabajo.

A mi familia que siempre me han apoyado, guiado y cuidado con mucho amor. Gracias de corazón por todas las oportunidades que me han brindado.

A mis amigos de laboratorio M.C Claudia Bernardette Plata Hipólito y M.C Cesar Ivan Romo Sáenz, Dra. Griselda Menchaca, que siempre estuvieron a lado mío para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A Mayra A. Meléndez por llegar en el momento justo, por tu cariño y por ayudarme hasta donde te fue posible en la última etapa de este trabajo.

A todos mis amigos de generación del LIV y otras orientaciones.

¡A todos ustedes muchas gracias!

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia, que gracias a su apoyo pude concluir y obtener el grado de Maestría. A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

Y una dedicatoria especial a mi sobrino y ahijado Nicolás.
Eres tan pequeñito, pero das tanta luz a nuestra familia, me emociona verte crecer.

INDICE GENERAL

LUGAR DE TRABAJO.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	viii
ABSTRACT.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Respuesta inmunológica.....	5
Antivirales	7
Fitoterapia.....	8
JUSTIFICACIÓN	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
Objetivos específicos.....	14
METODOLOGÍA	15
1.- Subcultivo celular	15
2.- Propagación de la cepa Wa de rotavirus en células MA104.....	15
2.1.- Titulación de focos infecciosos	16
2.2.- Multiplicidad de infección.....	17
3.- Obtención de extractos acuosos.	17
4.- Obtención de extractos hidro-etanólicos.....	17
5.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de plantas.....	18
5.1.- Ensayo de viabilidad celular en células MA-104 con los extractos de plantas por bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)..	18
6.- Actividad antiviral de los extractos de plantas.....	18
7.- Efecto de los extractos en la expresión de los genes de las proteínas virales NSP2.....	19
y NSP5.....	19
7.1 Extracción de RNA	19
7.2 RT-PCR Transcripción reversa.....	20
7.3 Amplificación de NSP2 y NSP5	20

8.- Efecto de los extractos de plantas sobre la expresión del IFN- β con actividad inmunológica mediante RT-PCR	21
8.1 Detección del IFN- β por RT-PCR.....	21
8.2 Amplificación del IFN- β	21
RESULTADOS	22
1. Subcultivo celular.....	22
2. Propagación de la cepa de rotavirus Wa en células MA-104.....	22
3. Extracción de extractos de plantas acuosos e hidro-etanólicos.....	23
4. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de plantas.....	24
5. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos de plantas	28
6. Efecto de los extractos en la expresión de los genes de las proteínas virales NSP2 y NSP5	35
7.- Efecto de los extractos en la expresión de IFN- β por RT-PCR	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIÓN	43
PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Secuencia de oligonucleótidos para los genes NSP2 y NSP5.....	20
Tabla 2.-	Secuencia de oligonucleótidos para los genes IFN- β y β -actina	21
Tabla 3.-	Rendimiento en peso de extractos de plantas.....	23

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Subcultivo de células MA-104.....	22
Figura 2.-	Infección de Rotavirus Wa 24 horas.....	23
Figura 3.-	Extractos acuosos e hidro-etanólicos liofilizados.....	24
Figura 4.-	Efecto citotóxico del extracto de <i>Allium sp.</i> sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.....	25
Figura 5.-	Efecto citotóxico del extracto de <i>Prosopis sp.</i> sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.....	25
Figura 6.-	Efecto citotóxico del extracto de <i>Musa sp.</i> sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.....	26
Figura 7.-	Efecto citotóxico de los extractos de <i>Allium sp.</i> sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.....	26
Figura 8.-	Efecto citotóxico de los extractos de <i>Allium sp.</i> sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.....	27
Figura 9.-	Efecto citotóxico de los extractos de <i>Allium sp.</i> sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.....	27
Figura 10.-	Actividad antiviral de extractos de <i>Allium sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.....	28
Figura 11.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Allium sp.</i>	29
Figura 12.-	Actividad antiviral de extractos de <i>Prosopis sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.....	29
Figura 13.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Prosopis sp.</i>	30
Figura 14.-	Actividad antiviral de extractos de <i>Musa sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.....	30
Figura 15.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Musa sp.</i>	31
Figura 16.-	Actividad antiviral del extracto de <i>Allium sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección.....	32
Figura 17.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Allium sp.</i>	32
Figura 18.-	Actividad antiviral del extracto de <i>Prosopis sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección.....	33
Figura 19.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Prosopis sp.</i>	33
Figura 20.-	Actividad antiviral del extracto de <i>Musa sp.</i> contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección...	34
Figura 21.-	Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de <i>Allium sp.</i>	34

Figura 22-	Detección de genes virales NSP2 y NSP5.....	35
Figura 23-	Análisis de expresión por densitometría de NSP2.....	36
Figura 24-	Análisis de expresión por densitometría de NSP5.....	36
Figura 25-	Efecto de los extractos sobre la expresión de Interferon- β	37
Figura 26-	Curva de expresión del Interferon- β	38

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

RV: Rotavirus

GE: Gastroenteritis

RNA: Ácido ribonucleico

Kpb: Kilopares de bases

nm: nanómetros

VP: Proteína viral

NSP: proteína no estructural

PMAP: Patrones moleculares asociados a patógenos

RRP: Receptores de reconocimiento de patrones

NF- κ B: Factor nuclear kappa b

IRF: Factores reguladores de interferón

AP-1: Proteína activadora 1

IFN: Interferón

TNF: Factor de necrosis tumoral

IL: Interleucina

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

β -TrCP: Proteína con repeticiones de β -transducina

I κ B: Inhibidor κ B

JAK: Quinasas Janus

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción

ISGs: Genes estimulados por el interferón

NOS: Óxido nítrico sintetasa

ABSTRACT

Rotavirus were recognized as a major cause of acute gastroenteritis affecting children under 5 years causing 2 million hospitalizations and up to 600,000 deaths per year worldwide where the deaths occur most frequently in developing countries. Although it has vaccines to prevent infection (Rotarix and RotaTeq), there is a potential risk of vaccine effectiveness due to the high genetic variability posed by these viruses. During viral infection, various cytokines that contribute to the reduction of viral replication are produced. However, rotavirus has multifunctional proteins that interfere at various levels in non-specific or specific defense of the host cell. These viral proteins limit the expression of pro-inflammatory cytokines involved in both innate and adaptative immune response.

In this project the antiviral ability of extracts aqueous and hydro-ethanolic of *Musa sp.*, *Allium sp.* and *Prosopis sp.* was determined. Furthermore, it was determined the expression of two genes from two nonstructural proteins of rotavirus, NSP2 y NSP5 which are based on the formation of viral morphogenesis for viroplasms. Furthermore, we determined the expression of interferon- β , a pro-inflammatory cytokine important for the establishment of an antiviral activity through innate immunity.

As a result, the aqueous and hydro-ethanolic extraction of *Musa sp.* and *Allium sp.* showed to reduce production of infectious foci, also showed that the extracts do not have activity in the in the later stages of adhesion, the results suggest that the antiviral activity of plants originates at the pre-viral infection stage. Moreover, molecular analysis by RT-PCR showed that *Prosopis*, *Musa* and *Allium* extracts, inhibit expression of the viral genes NSP2 and NSP5 in a range of 74% to 99% respectively at 12 hours post-infection. Also, was by RT-PCR detected that extracts generate a pro-inflammatory effect that stimulate the production of IFN- β which induces an antiviral state through activation of diversers mechanisms.

The results would increase the knowledge about the importance of the extracts in viral morphogenesis and its importance in the establishment of innate immunity.

RESUMEN

Rotavirus es reconocido como el mayor agente causal de gastroenteritis severa, afectando a niños menores de 5 años de edad, causando 2 millones de hospitalizaciones y hasta 600,000 muertes al año en el mundo, siendo los países en vías de desarrollo donde los decesos se presentan con mayor frecuencia. A pesar de que se cuenta con vacunas para prevenir la infección (Rotarix y RotaTeg), existe el riesgo potencial de la efectividad de las vacunas debido a la alta variabilidad genética que presentan estos virus. Durante la infección viral, se producen diversas citocinas que contribuyen a la reducción de la replicación viral. No obstante, rotavirus posee proteínas multifuncionales que interfieren a diversos niveles en la defensa inespecífica o específica de la célula hospedera. Estas proteínas virales limitan la expresión de citocinas pro-inflamatorias que participan en la respuesta inmune tanto innata como adquirida.

En el presente proyecto se determinó la capacidad antiviral de extractos de *Musa sp.*, *Allium sp.* y *Prosopis sp.* tanto acuosos como hidro-etanólicos. Además, se detectó la expresión de dos genes de las proteínas no estructurales de rotavirus NSP2 y NSP5, las cuales son la base en la formación de viroplasmos durante la morfogénesis viral. Del mismo modo, se determinó la expresión del interferon- β en células MA-104 una citocina pro-inflamatoria importante para el establecimiento de una actividad antiviral a través de la inmunidad innata.

Como resultado las extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *Musa sp.* y *Allium sp.* demostraron efectividad anti-rotavirus al reducir la producción de focos infecciosos, así mismo, se demostró que los extractos no presentan actividad en las etapas posteriores a la adhesión, los resultados obtenidos sugieren que la actividad antiviral de las plantas se origina en la etapa de pre-infección viral. Además, el análisis molecular por RT-PCR demostró que los extractos *Prosopis*, *Musa* y *Allium* inhiben la expresión de los genes virales de NSP2 y NSP5 en un rango de 74% hasta un 99% respectivamente a las 12 horas postinfección. Así mismo, se detectó RT-PCR que los extractos generan un efecto pro-inflamatorio en células MA-104 que favorece la producción de IFN- β , mismo que inducen un estado antiviral a través de la activación de diversos mecanismos.

Estos resultados ampliarán el conocimiento sobre la importancia de los extractos en la morfogénesis viral de rotavirus y su importancia en el establecimiento de la

inmunidad innata. El potencial que presenta rotavirus para escapar a la respuesta inmune innata y adquirida, es un factor que ha estimulado la búsqueda de métodos alternativos que coadyuven en su control.

INTRODUCCIÓN

La infección por rotavirus es una de las principales causas de gastroenteritis severa en niños menores de 5 años de edad, con un impacto importante desde el punto de vista de morbilidad y mortalidad. La gastroenteritis por rotavirus carece de tratamiento específico, la atención de los síntomas del paciente se basa fundamentalmente en una rehidratación oportuna (Desselberger 2014). Asimismo, se han realizado cuantiosos esfuerzos por disminuir los brotes anuales a través del desarrollo de vacunas con base en las cepas más recurrentes (Perez 2012). Sin embargo, aunque estos biológicos actualmente muestran efectividad en disminuir la severidad de las infecciones con cepas homólogas, la acumulación de mutaciones, los rearrreglos génicos y las recombinaciones durante co-infecciones, puede generar nuevas variedades con características antigénicas diferentes que escapan a la inmunidad adquirida previamente (Desselberger 2014).

Rotavirus una vez dentro de la célula es sometido a los mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos destinados a eliminarlo (Kindt, Goldsby et al. 2007). Sin embargo, estos virus poseen proteínas multifuncionales que interfieren con las defensas inespecíficas o específicas del hospedero. La proteína no estructural (NSP1) interfiere con la activación y la translocación de factores de transcripción como NF- κ B y IRF3/7, como consecuencia, se limita la expresión de citocinas pro-inflamatorias que juegan un papel muy importante en la defensa antiviral.

Entre la gran variedad de citocinas producidas por células epiteliales durante una infección por rotavirus, destacan por su efecto antiviral los interferones, los cuales inhiben la replicación del virus tanto en células infectadas y no infectadas. Otras citocinas son el TNF- α y la IL-1, las cuales están implicadas en varias actividades celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, así como la IL-8, la cual es un potente quimiotáctico de neutrófilos y que además potencia las funciones de las células NK. Estas citocinas son parte integral de la primera línea de defensa contra virus representada por la respuesta inmune innata (Holloway and Coulson 2013).

El potencial que presenta rotavirus para escapar a la respuesta inmune innata y adquirida, es un factor que ha estimulado la búsqueda de métodos alternativos que coadyuven en su control. En este respecto, los extractos naturales de plantas han sido blanco de estudio en la búsqueda de moléculas con actividad antiviral. Existe evidencia que compuestos naturales como taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas y terpenos

obtenidos de extractos de plantas muestran actividad antiviral contra rotavirus (Cecílio, de Faria et al. 2012), sin embargo, estos estudios se han enfocado a determinar la actividad antiviral a través de la disminución del efecto citopático (Takahashi, Matsuda et al. 2001; Andres et al. 2007).

Por otro lado, existe evidencia que muestran que células de carcinoma epidermoide humano (HEp2) tratadas con extractos de plantas (*Panax ginseng*) inducen la producción de citocinas como el IFN- γ (Lee, Lee et al. 2015). Asimismo, se ha observado que compuestos naturales como los flavonoides tienen propiedades inmunomoduladoras al participar en la diferenciación de células de origen mieloide (Mace, King et al. 2014). Lo anterior muestra una perspectiva de la importancia de los extractos naturales de plantas con actividad antiviral. No obstante, la amplia variedad global de plantas terapéuticas que actualmente se utilizan de forma empírica para el tratamiento de la gastroenteritis, la mayoría de ellas carecen de estudios que avalen sus propiedades. En este estudio, la vaina del mezquite (*Prosopis* sp.), cáscara de plátano (*Musa* sp.) y ajo (*Allium* sp.) se utilizan en nuestro país de forma empírica para el tratamiento de desórdenes digestivos. Los extractos de estas plantas han mostrado efecto antimicrobiano incluyendo antiviral (Goncagul and Ayaz 2010; Lee, Miyake et al. 2012; dos Santos, Pereira et al. 2013; Karuppiyah and Mustaffa 2013). Sin embargo, los estudios se han enfocado a determinar de forma general, únicamente por unidades formadoras de placa y/o efecto citopático esta actividad antiviral.

En el presente proyecto se determinó la capacidad antiviral de los extractos acuosos e hidro-etanólicos de *Prosopis* sp., *Musa* sp., *Allium* sp. contra rotavirus usando la cepa de referencia Wa genotipo (G1P[8]). Esta capacidad antiviral se determinó a través de la reducción de focos infecciosos y la expresión de los genes virales de las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, las cuales son la base en la formación de viroplasma durante la morfogénesis viral de rotavirus. Además, se determinó en células MA-104 la producción del IFN- β una citocina pro-inflamatoria importante para el establecimiento de una actividad antiviral a través de la inmunidad innata. Los resultados amplían el conocimiento sobre la importancia de los extractos de plantas en la morfogénesis viral de rotavirus, así como su importancia en el establecimiento del primer mecanismo de defensa inmune representado por la inmunidad innata.

ANTECEDENTES

La gastroenteritis infecciosa se caracteriza por la disfunción y/o la inflamación del tracto gastrointestinal, los síntomas principales son diarrea, vómito y dolor abdominal; provocada por distintos microorganismos como bacterias, virus, parásitos y protozoos o sus toxinas. Además, representa una de las principales causas de morbilidad mundial y constituye una de principales causas de mortalidad en países en vías de desarrollo (Elliott 2007).

La gastroenteritis viral es una causa importante de diarrea grave, tanto en adultos como en niños y es causada por una variedad de virus como Adenovirus, Norovirus, Coronavirus, Astrovirus y Rotavirus (Oh, Gaedicke et al. 2003; Clark and McKendrick 2004).

De ellos, la infección por Rotavirus es el principal agente causal de diarrea severa en niños menores de 5 años de edad con un impacto importante desde el punto de vista de morbilidad y mortalidad. Causa aproximadamente 111 millones de episodios de GE al año, de los cuales unos 25 millones implican visitas médicas, con unos 2 millones de hospitalizaciones y hasta unas 600,000 muertes (Ramig 2004; Parashar 2006; Angel, Franco et al. 2007).

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Se caracteriza por presentar una simetría de tipo icosaédrica, y contiene un genoma de tipo RNA de doble cadena. Este genoma se encuentra dividido en 11 segmentos que varían en tamaño desde 0.6 a 3.3 Kpb. Cada segmento génico codifica para una proteína a excepción del segmento 11 que presenta dos marcos de lectura.

El tamaño de la partícula madura de rotavirus varía de 70-90 nm. En su estructura posee tres capas concéntricas de proteínas; la capa más interna se organiza en un complejo ribonucleoprotéico formado por el RNA genómico y las proteínas denominadas VP1 y VP3 rodeadas por la proteína VP2. La capa media está formada solo por la proteína VP6, siendo responsable de la estructura icosaédrica de rotavirus. Por último, la capa más externa, está constituida por las proteínas VP7 y VP4, donde VP4 se proyecta al exterior en forma de espículas. VP4 es responsable de la adherencia al receptor celular, por lo que está involucrada en los procesos de penetración del virus a la célula hospedera (Fields, Knipe et al. 2001).

Rotavirus infecta las vellosidades del intestino delgado, *in vitro* estos virus también muestran un tropismo hacia líneas celulares que derivan de epitelio renal o intestinal. Se ha descrito que la etapa de reconocimiento celular se lleva a cabo por un proceso donde intervienen varios receptores celulares, que incluyen a las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$ y a la proteína hsc70, además de estas proteínas también se ha sugerido la presencia de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos. Actualmente se ha propuesto que rotavirus ingresa a la célula hospedera a través de endocitosis o penetración directa (López, Ayala-Breton et al. 2008).

Durante el proceso de entrada, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones. Pueden constituirse como RNAs mensajero virales que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VP1-VP7) y las seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) del virus, y pueden ser utilizados como templados para las síntesis de la cadena negativa durante el proceso de replicación del genoma viral.

A partir de las 4-8 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas “viroplasmas”, los cuales constituyen sitios de replicación viral. Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmas. El proceso de morfogénesis inicia en estas estructuras donde se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente son translocadas al interior del retículo endoplásmico. Durante este proceso se adquiere la tercera capa proteínica, dando lugar a la partícula madura (López, Rojas et al. 2005).

El ciclo de replicación concluye con la liberación de las partículas virales hacia el lumen intestinal lisando a la célula hospedera y siendo capaces de infectar enterocitos sanos y repetir el ciclo.

Respuesta inmunológica.

La respuesta inmune antiviral comprende una interacción compleja entre las células infectadas y las células efectoras del hospedero. Las principales células efectoras durante la respuesta antiviral son las células NK y fagocitos (neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas) (Henao, Bedoya et al. 2012).

El sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Este reconocimiento lo realizan a través de moléculas denominadas receptores de reconocimiento de patrones (RRP). De ellos, los receptores tipo Toll, juegan un papel importante en el reconocimiento de genomas virales. Estos receptores se encuentran distribuidos en la membrana plasmática y en membranas endosomales. La interacción de alta afinidad entre estos receptores y sus ligandos conduce a la activación de vías de señalización y de mecanismos efectoras antivirales desplegados por la célula infectada, así como por las células de la respuesta innata (Kindt, Goldsby et al. 2007). Estas vías convergen en la activación de proteínas cinasas, que a su vez, activan factores de transcripción donde resaltan NF- κ B, IRF y AP-1, que estimulan la producción de diversas citocinas (Holloway and Coulson 2013).

Las citocinas son proteínas solubles que juegan un papel muy importante en la defensa antiviral (Rollo, Kumar et al. 1999). Sus efectos son generalmente pleiotrópicos. Algunas citocinas importantes son el TNF- α y la IL-1. Estas citocinas están implicadas en varias actividades celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación celular. Así mismo la IL-8 otra citocina pro-inflamatoria, es un potente quimiotáctico de neutrófilos, y activa células como macrófagos y linfocitos T, potencia las funciones de las células NK, y también puede tener un papel importante en la expansión clonal de las células B (Sheth, Anderson et al. 1996).

Entre la gran variedad de citocinas producidas durante una infección viral, se destaca, por su efecto antiviral, el interferón, el cual inhibe la replicación del virus tanto en células infectadas y no infectadas. Dentro de las células que producen interferón se encuentran leucocitos, fibroblastos y las células epiteliales. Estas células responden a diferentes estímulos, particularmente a la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA).

Además, existen varios tipos de interferón clasificados como interferón tipo I, II y III. Los interferones tipo I inducen un estado antiviral a través de la activación de diversos mecanismos. Dentro de estos mecanismos, sobresalen la inducción de la enzima 2'5'oligoadenilato sintetasa y la proteína cinasa R dependiente de dsRNA. Estas enzimas activan la RNasa L que degrada el RNA mensajero viral evitando la replicación del mismo. Además, el interferón también induce la síntesis de la proteína Mx la cual es un mediador intracelular que inhibe la RNA polimerasa viral de ciertos virus y por consecuencia inhibe el ciclo replicativo viral. Otros efectos del interferón en la defensa antiviral, son la activación de células NK, macrófagos y linfocitos T citotóxicos (Fensterl and Sen 2009).

La larga co-evolución de virus y hospederos, ha llevado a que los virus hayan desarrollado estrategias para evadir los mecanismos de defensa. Entre estas estrategias se pueden mencionar la variación antigénica, la inhibición de la expresión de moléculas de MHC, la inhibición del interferón y sus rutas de señalización, inhibición de citocinas, infección de células de la respuesta inmune e inhibición de apoptosis entre otras, con las cuales asegura una infección productiva (Henao, Bedoya et al. 2012).

En lo que respecta a rotavirus, estos virus poseen proteínas multifuncionales que interfieren con las defensas inespecíficas o específicas del hospedero. La proteína no estructural NSP1 está involucrada en limitar la expresión de IFN tipo I en células infectadas, por antagonizar con la función de los factores reguladores de interferón IRF 3,5 y 7.

La proteína NSP1 media la degradación de la proteína que contiene repeticiones de β -transducina (β -TrCP) lo cual es requerido para la degradación del inhibidor κ B (IkB) y la subsecuente activación del NF- κ B. Como consecuencia se limita la expresión de citocinas pro-inflamatorias que juegan un papel muy importante en la defensa antiviral (Barro and Patton 2007).

Otra ruta que se ve afectada por la proteína NSP1 es la vía JAK/STAT al mediar la degradación de STAT, interrumpiendo la formación del complejo conocido como factor estimulante de IFN, que induce la expresión de los genes estimulados por el interferón (ISGs) muchos de los cuales tienen la capacidad de inhibir directamente la replicación de virus (Holloway and Coulson 2013).

El potencial que presenta rotavirus para escapar a la respuesta inmune innata y adquirida es un factor que ha estimulado la búsqueda de métodos alternativos que coadyuven en su control.

Antivirales

Los antivirales son aquellos compuestos capaces de inhibir una o varias etapas del ciclo de multiplicación viral dentro de la célula hospedero. Uno de los objetivos de la producción de estos antivirales está dirigido a una quimioterapia selectiva, que inhiba la replicación viral a concentraciones no tóxicas para el hospedero. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de drogas se encuentra obstaculizado por la utilización del virus de la maquinaria intracelular para su replicación. Al utilizar el virus las mismas rutas que utiliza la célula en su metabolismo es un factor importante que limita una quimioterapia exitosa (del Castillo MF ; Penié 1998; Rosenberg 2004).

Por tal motivo, el mecanismo de acción de los antivirales, se centra en la inhibición de algún proceso esencial para la replicación viral que no involucre ningún paso del metabolismo de célula. De acuerdo al mecanismo de acción específico de cada compuesto, los antivirales pueden ser clasificados en: compuestos que interaccionan directamente con sus blancos de acción o compuestos que necesitan primero una activación intracelular. La amantadina, la rimantadina y el foscarnet son ejemplos que actúan con sus blancos de acción sin necesidad de una activación previa. Por el contrario, los análogos de nucleósidos, como el aciclovir, necesitan ser activados mediante la fosforilación por quinasas celulares y/o virales para luego interactuar con sus blancos. A su vez, los análogos de nucleósidos pueden inhibir competitivamente la elongación de su genoma o ser incorporados al mismo produciendo la terminación de esta cadena, interfiriendo de esta forma con la replicación viral (Rosenberg 2004).

En los últimos años se han realizado estudios sobre numerosos fármacos, muchos compuestos muestran actividad antiviral *in vitro* pero tienen efectos tóxicos para la célula huésped. Característicamente los fármacos más eficaces actúan inhibiendo la acción de alguna enzima viral específica (polimerasa, transcriptasa). Sin embargo, las variaciones genéticas que se presentan en estos virus pueden ser suficientes para ocasionar resistencia al producto antiviral indicando que el fármaco posee un mecanismo de acción específico.

Existen ejemplos de fármacos hasta ahora descritos que inhiben la replicación activa de los virus, no obstante, esta replicación puede reanudarse después de dejar de usar el

fármaco (Penié 1998). Esta situación impulsa a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las infecciones virales.

Fitoterapia

La fitoterapia es el tratamiento de enfermedades a través de las especies vegetales y sus derivados la cual ha sido utilizada desde la antigüedad. Existe evidencia que la utilización de productos naturales obtenidos de plantas, es una alternativa atractiva no sólo para el tratamiento de rotavirus, sino también para el tratamiento de enfermedades causadas por otros virus como influenza, herpes e incluso el SIDA (Jassim and Naji 2003; Lecoin 2007).

Hoy en día, existe una considerable proporción de la población mundial que prefiere el uso de la medicina natural para el tratamiento o prevención de enfermedades. Se ha reconocido que alrededor del 80% de la población que vive en países en vías de desarrollo dependen casi exclusivamente de la medicina tradicional para remediar sus problemas de salud (Cos, Maes et al. 2004). Esto ha influenciado a las compañías farmacéuticas para producir nuevas formulaciones antimicrobianas con base en extractos de plantas.

Considerando que la utilización de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades es una práctica común, la evaluación de extractos con actividad antiviral es una alternativa para la elaboración de nuevos fármacos efectivos (Jassim and Naji 2003).

Existen estudios donde se ha demostrado la capacidad anti-rotavirus de determinados compuestos extraídos de plantas como *Stevia rebaudiana*, *Sophora flavescens*, *Nelumbo nucifera* por mencionar algunos, con resultados alentadores, sin embargo, es necesario continuar con sus evaluaciones para obtener resultados concluyentes y el análisis de sus efectos *in vivo* (Takahashi, Matsuda et al. 2001; Andres et al. 2007).

De la amplia variedad global de plantas terapéuticas que se utilizan, la mayoría de ellas carecen de estudios que avalen sus propiedades. Tal es el caso del mezquite (*Prosopis* sp), plátano (*Musa* sp.), ajo (*Allium* sp.) que en nuestro país son ampliamente utilizadas de forma empírica para el tratamiento de desórdenes digestivos.

El ajo es una planta bulbosa, que pertenece a la familia *Liliaceae* del genero *Allium* fácilmente cultivable en todo tipo de climas. Esta planta, gracias a sus principios activos, desarrolla una actividad antibacteriana, antiséptica, antiinflamatoria, antimicótica; potencia los efectos de los antihipertensivos y anticoagulantes y también se considera un estimulante y expectorante por mencionar algunos.

El consumo de ajo ayuda en el metabolismo de la grasa, aumentando los niveles de HDL y reduciendo el LDL y triglicéridos. Estudios *in vitro* han mostrado efectos antiateroscleróticos por la reducción de la expresión del mRNA de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la inhibición de la oxidación de la LDL inducida por el lactato deshidrogenasa. Además se ha reportado que la administración de suplementos de ajo junto con la medicación antidiabética proporciona mejor control de la diabetes tipo 2 (Ashraf, Khan et al. 2011; Majewski 2014) .

Se ha demostrado que el ajo es eficaz contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, como *H. pylori*, *E. coli*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus* (Goncagul and Ayaz 2010). Además, su actividad antifúngica se ha demostrado contra *C. albicans*, *H. capsulatum* y *Aspergillus*. Algunos compuestos presentes en el ajo que se muestran involucrados en esta actividad son al alicina, el ajoeno y el trisulfuro de dialilo (Goncagul and Ayaz 2010; Watson, Grando et al. 2014).

Por otra parte estudios realizados en china con extractos de *A. sativum* mostraron actividad antiviral *in vitro* contra el virus herpes simple e influenza tipo B, en el cual se determinó que concentraciones de 150 µg/ml redujo significativamente el título de infectividad de estos virus (Tsai, Cole et al. 1985). Además también se ha reportado actividad antiviral contra virus como citomegalovirus y rinovirus humano tipo 2 (Majewski 2014).

Estudios han demostrado que el ajo tiene efectos que aumentan la inmunidad, como la estimulación de la proliferación de linfocitos. Diferentes extractos de ajo han demostrado estimular la actividad fagocitaria de los macrófagos, a la vez que incrementan la actividad de células natural killer e interferón gamma (Luengo 2007).

El plátano es una fruta tropical que pertenece a la familia botánica *Musaceae* y al género *Musa*. Esta planta no sólo se aprecia por el valor nutritivo de sus frutos, también por las propiedades medicinales que se le atribuyen. Se ha demostrado la propiedad del *Musa paradisiaca* para la prevención de úlceras gástricas su actividad antidiarreica y su capacidad para proteger la mucosa intestinal. Estudios demuestran que extractos de *Musa sp.* Tuvieron una efectiva actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter sp.* y *P. mirabilis* (Karupiah and Mustaffa 2013).

En otros estudios, extractos metanólicos de semillas de *M. sapientum* mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*. Además, se demostró su actividad antidiarreica. Se asoció a los flavonoides presentes en el extracto con la inhibición de prostaglandinas, las cuales están involucradas en la contracción del músculo liso, de este modo disminuyó la motilidad gastrointestinal, que fue evidente por la reducción de evacuaciones líquidas totales inducida en ratones (Hossain, Alam et al. 2011).

Dentro de la actividad antiviral se reportó que la lectina del plátano puede actuar como un potente inhibidor de la replicación del VIH, al unirse a las proteínas de envoltura glicosiladas como gp120 bloqueando la entrada a la célula (Singh, Devi et al. 2014). En otro estudio Cheung *et al.* Reportó que la lectina de *M. acuminata* fue capaz de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa de VIH-1, además de inducir la expresión de citocinas tales como el interferón gamma, TNF- α y la IL-2 en esplenocitos murinos (Cheung, Wong et al. 2009).

El mezquite es un recurso natural del género *Prosopis* de la familia *Fabaceae*, es muy difundido en México y es de distribución ecológica particularmente vasta, conocido por ser de valor medicinal. La infusión de algunas partes de la planta es utilizada para combatir la disentería, infusiones de hojas se emplea para combatir algunas afecciones oculares. Se ha reportado actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas frescas y maduras del mezquite mostrado acción antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* (Reséndez Velázquez 2013). Otro estudio empleo extractos metanólicos de *Prosopis juliflora* mostraron actividad antibacteriana contra *Micrococcus luteus*,

Bacillus cereus, *Shigella sonnei* y *P. aeruginosa*, Mostrando el extracto un mejor efecto cuando se comparó con la amoxicilina y metilicina (T. Naji 2012).

Lo anterior muestra una perspectiva de las abundantes propiedades medicinales de los extractos de plantas incluyendo la actividad antiviral. Teniendo en cuenta estos antecedentes ha resultado particularmente interesante la búsqueda de terapias anti-rotavirus basada en extractos naturales acuosos e hidroetanólicos de *Prosopis sp*, *Musa sp*, y *Allium sp*, que actualmente se utilizan de forma empírica para el tratamiento de desórdenes digestivos en nuestro país. En este estudio se amplía el conocimiento sobre la importancia de los extractos de plantas en la morfogénesis viral de rotavirus, así como su importancia en el establecimiento de la respuesta inmune innata. Este tipo de investigaciones permitirá elaborar tratamientos de bajo costo y accesibles ofreciendo mejores expectativas de salud.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, rotavirus sigue siendo uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis, este virus afecta principalmente a la población infantil. La pérdida de líquidos a través de la diarrea y vómito pueden conducir a deshidratación severa con riesgo de la vida del paciente. Estos virus mutan constantemente por errores de la polimerasa viral o rearrreglos de sus genes durante coinfecciones con diferentes cepas virales. Lo cual pone en riesgo la efectividad de la vacuna contra rotavirus que actualmente se aplica. Adicionalmente, la proteína no estructural NSP1 es capaz de inhibir la inmunidad innata que se ejerce a través del interferón. Ante este escenario, surge cada vez más el interés por nuevos compuestos que coadyuven en el control de gastroenteritis viral. En este estudio *Prosopis* sp., *Musa* sp., y *Allium* sp, se evaluaron en su actividad antiviral en células infectadas con rotavirus y tratadas con extractos acuoso e hidro-etanólico a través de la reducción de focos infecciosos, detección de las proteínas virales, así como la producción del IFN- β importantes para el establecimiento de una actividad antiviral a través de la inmunidad innata. El hallazgo de nuevas alternativas para inhibir la replicación viral y la estimulación de citocinas clave en el establecimiento de la respuesta inmune anti-rotavirus, ofrecerá mejores expectativas de control para la gastroenteritis viral.

HIPOTESIS

Los extractos de plantas acuosos e hidro-etanólicos poseen actividad antiviral contra rotavirus, inhiben la expresión de los genes virales NSP2 y NSP5 e inducen la expresión del IFN- β .

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral de los extractos de plantas y su efecto sobre expresión de los genes virales NSP2 y NSP5 e interferón- β en células MA-104 infectadas por rotavirus y tratadas con el extracto de plantas.

Objetivos específicos

- Determinar la actividad antiviral de los extractos de plantas antes y después de la infección viral.
- Evaluar el efecto de los extractos de plantas sobre la expresión de los genes de rotavirus 8 y 11 en una infección viral.
- Evaluar el efecto de los extractos de plantas sobre la expresión de IFN- β en células MA-104.

METODOLOGÍA

1.- Subcultivo celular

La línea celular MA-104 (epiteliales embrionarias de riñón de mono *Cercopithecus aethiops*) se cultivó en frascos de 25 cm², hasta que la monocapa estuviera confluyente, se realizó un subcultivo. Bajo condiciones de esterilidad se retiró el medio de cultivo, utilizando una bomba de vacío. Posteriormente se lavaron las células añadiendo al frasco de cultivo, 2 ml de una solución de EDTA 0.68 mM. La solución de EDTA se retiró con una pipeta Pasteur y se agregaron 500 µl de tripsina 0.25% por 2 minutos. Se agregaron 2ml de medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 3% para inactivar la tripsina. Las células se homogenizaron con una pipeta para evitar la formación de aglomerados. Posteriormente se tomaron 250 µl de las células (aprox. 500,00 células) se pasaron a un nuevo frasco de cultivo de 25 cm², el cual contenía 4.5 ml de medio D-MEM-SFB 3%, que fue previamente etiquetado con el nombre de la línea celular y el número de pase. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por cuatro días.

2.- Propagación de la cepa Wa de rotavirus en células MA104

La propagación de cepas de rotavirus en cultivo celular se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito por Taniguchi y colaboradores (Taniguchi *et al.*, 1988). Se tomó una alícuota de 300 µl de la cepa de rotavirus Wa, que fue activada con 1 µl de tripsina al 1% (concentración final de 10 µg/ml) incubándose a 37°C por 30 min. Transcurrido el tiempo el virus activado se agregó a la monocapa de células MA-104 producidas en tubos de 5 cm². Las células fueron lavadas previo a la infección 2 veces con 1 ml de PBS 1X. la infección incubó a 37°C por 1 hora y después se adicionó 2 ml de medio esencial mínimo (MEM) sin suero fetal bovino. Los tubos se mantuvieron en incubadora a 37°C bajo una atmosfera de 5% CO₂, hasta observar el efecto citopático. Cuando existió más del 50% de la monocapa celular destruída (24-48 horas post infección) se suspendió la incubación. El tubo de 5 cm² con las células infectadas se congeló a -20°C por 30 min y después se descongelaron en agua tibia a 37°C por 10 minutos, repitiéndose este procedimiento 3 veces. Se realizaron alícuotas del lisado celular de 500 µl y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.1.- Titulación de focos infecciosos

La cuantificación de partículas virales infecciosas (UFF/ml) en los lisados celulares, se basó en el protocolo de tinción con Inmunoperoxidasa descrito por Arias y colaboradores (Arias CF 1987). Se activó una alícuota de 350 µl con 1 µl de tripsina 1% (10ug/ml concentración final) de lisado celular con la cepa de rotavirus Wa, incubándose 30 min a 37°C. Posteriormente en una placa de 96 pozos estéril, se preparó por duplicado 200 µl de las diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 del virus activado en MEM sin suero. La placa de 96 pozos con células MA-104, se lavó en 2 ocasiones con 200 µl de PBS 1X y después se añadieron 50 µl de cada dilución del virus. Además, se incluyeron 2 pozos con 50 µl del virus concentrado (sin diluir). Las células se incubaron a 37°C por una hora. Se retiraron los virus y se lavó una vez con 200 µl de PBS 1X, después se agregaron 150 µl de MEM sin suero. La placa se incubó a 37°C por 14 horas. Al término de esta incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con 200 µl de PBS 1X, y las células se fijaron a la placa de plástico adicionando 100 µl de Acetona 80%-PBS 5X, incubando 40 minutos a temperatura ambiente (condiciones sin esterilidad). Posteriormente se lavó los pozos 2 veces con 200 µl de PBS 1X y se adicionaron 75 µl de Anti-rotavirus (Anti-TLP's) diluido 1:1,000 en PBS 1X. La placa se incubó a 37°C por una hora. Se retiró el anticuerpo y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS 1X, después se adicionaron 75 µl de Proteína A unida a Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:700. Se incubó a 37°C durante una hora. Se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS 1X y se agregaron 75 µl de Carbazol (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C por 15 minutos en oscuridad y la reacción enzimática se detuvo lavando la placa con agua corriente 5 veces. El título de unidades formadoras de focos infecciosos se determinó en la dilución donde se contó entre 100 y 200 focos. El número de UFF/ml fue determinado con la siguiente fórmula:

2.2.- Multiplicidad de infección

$$\text{UFF/ml} = 20 \times 5.5 \times \text{promedio de focos} \times \text{dilución}$$

Donde:

20 = Objetivo 20X del microscopio invertido

5.5 = Diámetro (mm) de un pozo de la placa 96 pozos

Promedio = Se obtiene un promedio del número de focos de los dos pozos de cada dilución

Dilución = Dilución donde se contó de 100-200 focos infecciosos

MOI: UFF/Numero de células

3.- Obtención de extractos acuosos.

Para el proceso de extracción se utilizó 200 g de vaina y semillas de mezquite (*Prosopis sp*), cascara de plátano (*Musa sp.*) y ajo (*Allium sp*) respectivamente, se desinfectaron con una solución de cloro 1% durante 5 minutos, una vez desinfectadas fueron depositadas en 500 ml de agua bidestilada en un vaso de precipitado y permanecieron a 100°C durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se filtró usando un filtro Whatman número 2 para retirar las partículas de gran tamaño, el producto de filtración se sometió a un proceso de liofilización por 12-24 horas para recolectar el extracto en polvo.

4.- Obtención de extractos hidro-etanólicos.

A partir de una solución de 500 ml de agua-etanol (1:1) en un vaso de precipitado se agregaron 200 g de vaina y semillas de mezquite (*Prosopis sp*), cáscara de plátano (*Musa sp.*) y ajo (*Allium sp*) respectivamente, y se incubaron por 24 horas a 37°C. Previamente se desinfectaron con cloro 1% durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo se filtró con un filtro Whatman número 2 para retirar las partículas de gran tamaño, el producto de filtración se sometió a un proceso de liofilización por 12-24 horas para recolectar el extracto en polvo.

5.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de plantas.

5.1.- Ensayo de viabilidad celular en células MA-104 con los extractos de plantas por bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Se cultivaron 1×10^4 células epiteliales de riñón de mono (MA-104) en medio D-MEM (Gibco) enriquecido con 3% suero fetal bovino (Gibco) bajo una atmósfera a 37°C con 5% de CO₂ en placas de 96 pozos por 24 horas. Se tomaron en cuenta controles de crecimiento a los cuales no se agregó ningún componente. A los pozos experimentales se agregaron 100µl de los extractos de plantas a diferentes concentraciones cuando el cultivo celular llegó a un 90% de confluencia, misma que se observó en el microscopio. La exposición del extracto en las células se evaluó en un tiempo de incubación de 24 horas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de solución bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT Cell Viability Assay Kit Biotium) por pozo, homogenizando ligeramente o agitando brevemente y se incubó a 37°C durante 3 horas. Después se añadieron 200µl de DMSO para disolver el formazan (MTT reducido) pipeteando varias veces. Posteriormente se utilizó el lector de placas de ELISA iMark® Microplate Absorbance Reader (BioRad) a una longitud de onda de $\lambda_{570\text{nm}}$. Cada experimento se desarrolló por triplicado para confirmar los resultados.

6.- Actividad antiviral de los extractos de plantas.

A partir de un cultivo de células MA-104 confluentes en un frasco de cultivo de 25 cm², se inoculó una placa de 96 pozos con 1×10^5 células por pozo y se incubó por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se realizó una mezcla de un volumen final de 100 µl que contenía una dilución 1:16 (MOI de 0.1) del lisado de la cepa de rotavirus Wa, y las concentraciones no citotóxicas de los extractos, 2.5-0.01 mg/ml para *Allium sp.* y *Prosopis sp.* y 0.62-0.01 mg/ml para *Musa sp.* y se incubó durante una hora antes de ser usado en la infección celular. Posteriormente se adicionaron los 100µl de la mezcla virus-extracto, a células MA-104 en placas de 96 pozos incubándose nuevamente por 1 hora. Transcurrido este tiempo se retiró la mezcla, y se añadió 100µl medio de mantenimiento MEM y se incubó por 14 horas para realizar la tinción de focos infecciosos usando el protocolo descrito previamente en el punto 2.1.

Para evaluar la actividad en los pasos posteriores a la penetración, se infectó un cultivo de células MA-104 con rotavirus Wa (previamente activado y diluido 1:16) por 1 hora a 37°C, después se añadieron las diferentes concentraciones no citotóxicas de los extractos, 2.5-0.01 mg/ml para *Allium sp.* y *Prosopis sp.* y 0.62-0.01 mg/ml para *Musa sp.* incubándose por una 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo se retiró el extracto y se lavaron una vez con 200µl de PBS a 1X, se agregaron 100µl de medio MEM incubándose durante 14 horas. Después se realizó la tinción de focos infecciosos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.- Efecto de los extractos en la expresión de los genes de las proteínas virales NSP2 y NSP5

Se pre-incubó rotavirus Wa con una MOI de 0.1 (previamente activado con 1µl de tripsina 1%) con los extractos de *Allium sp.*, *Prosopis*, y *Musa sp.* acuosos e hidroetanólicos usando la concentración no citotóxica de 0.31 mg/ml por 1 hora a 37°C, transcurrido el tiempo se infectaron células MA-104 (aproximadamente 1×10^6), en una placa de 6 pozos por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadió medio MEM (Gibco) y se detuvo el proceso infectivo a las 14 horas de incubación. Las células se desprendieron de los pozos agregando 300 µl de Trizol y se realizó la extracción de RNA.

7.1 Extracción de RNA

Para la determinación de transcritos se extrajo el RNA a partir de las células desprendidas por el método de Trizol, se retiró el medio de cultivo de MEM (Gibco) a cada uno de los 6 pozos de placa y se agregó 500 µl Trizol. Las células se colectaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 ml, se añadió 0.2 volúmenes de cloroformo se mezclaron por inmersión 3 veces y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se recuperó la fase acuosa y se añadió 0.7 volúmenes de isopropanol frío se mezcló por inmersión 10 veces. Se centrifugó a 13,000 por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet en 2 ocasiones con 500 µl etanol al 70°C. se dejó secar el etanol y el RNA se resuspendió con 20 µl de agua miliQ. Se conservó a -20°C hasta su uso.

7.2 RT-PCR Transcripción reversa

El RNA total se sometió a una transcripción inversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV Reverse Transcriptase®, PROMEGA), para obtener el cDNA se utilizó el primer oligo random d(N)6.

El protocolo de la reacción se ajustó a un volumen final de 25 µl. En tubos de microcentrífuga de 0.2 ml, se mezcló 2 µg de RNA purificado, 0.5 µg de primer random por cada microgramo de RNA en un volumen no mayor a 15 µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador (TERMOHYBAID *PCRsprint*) a 70°C por 5 minutos, y después se incubó en hielo. Posteriormente se adicionó una segunda mezcla de reactivos conteniendo 5 µl de Buffer M-MLV5X (PROMEGA), 5 µl de una mezcla de dNTP's 10mM (ATP, GTP, CTP, TTP) (Bioline) y 200 U de enzima RT (PROMEGA). Los tubos se colocaron en el termociclador para continuar con la reacción la cual se realizó a 37°C por 1 hora, seguido de 2 minutos a 94°C, para eliminar los residuos de la retrotranscriptasa. Al término de la reacción, los productos de RT-PCR se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.3 Amplificación de NSP2 y NSP5

El cDNA obtenido por RT-PCR se sometió a una reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa Red™ (BIOLINE), y oligonucleótidos específicos para NSP2 y NSP5, bajo las siguientes condiciones: 95°C (3 min), 95°C (30seg), 45°C (30seg), 72°C (30seg) por 35 ciclos, 72°C (3min) de extensión final. Los productos de PCR se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7% y fue teñido con bromuro de etidio. Se amplificó el gen de β-actina como control de carga. El análisis de expresión se realizó por densitometría usando el programa imagen 1.45k.

Secuencias de primers:

Nombre	Dirección	Secuencia	Producto (bp)	Temperatura de alineación
NSP2	En Sentido	5'- CCGTTTTGATAGCTATTGGTC - 3'	98	45°C
	Reverso	5'- CCACATAGTAAAAGCTGCG - 3'		
NSP5	En sentido	5'- CCATAGACACGCCAGCAT - 3'	94	45°C
	Reverso	5'- GGACCATCTGATTCTGCTTC - 3'		
β-actina	En Sentido	5'- GGCATCCTCACCCTGAAGTA - 3'	203	51°C
	Reverso	5' - GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA - 3'		

8.- Efecto de los extractos de plantas sobre la expresión del IFN- β con actividad inmunológica mediante RT-PCR

8.1 Detección del IFN- β por RT-PCR

Se realizó la extracción de RNA y la retrotranscripción usando la enzima transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV Reverse Transcriptase®, PROMEGA), y los primer oligo random d(N)6, como se describió anteriormente en el punto 7.1 y 7.2 respectivamente.

8.2 Amplificación del IFN- β

El cDNA obtenido por RT-PCR se sometió a una reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa RedTM (BIOLINE), bajo las siguientes condiciones, 95°C (3 min), 95°C (30seg), 47°C (30seg), 72°C (30seg), por 35 ciclos, 72°C (3min) de extensión final. Los productos de PCR se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7% y teñido con bromuro de etidio. Se amplificó el gen de β -actina como control de carga. El análisis de expresión se realizó por densitometría usando el programa imagen 1.45k.

Secuencia de primers:

Nombre	Dirección	Secuencia	Producto (bp)	Temperatura de alineación
IFN- β	En Sentido	5'- GGACAGGATGAACTTTGAC -3'	180	47°C
	Reverso	5'-GACAACCTCCCAGGCACAAGGGC-3'		
β -actina	En sentido	5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA - 3'	203	51°C
	Reverso	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA - 3'		

RESULTADOS

1. Subcultivo celular

Los cultivos de células MA-104 (epiteliales embrionarias de riñón de mono *Cercopithecus aethiops*). fueron incubados en un período de 72-96 horas a 37°C, en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ (Fig. 1). Se utilizaron subcultivos para los distintos experimentos de propagación viral, ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de los extractos, usando medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 3%. El desarrollo y morfología de los cultivos fue diariamente monitoreada por microscopía.

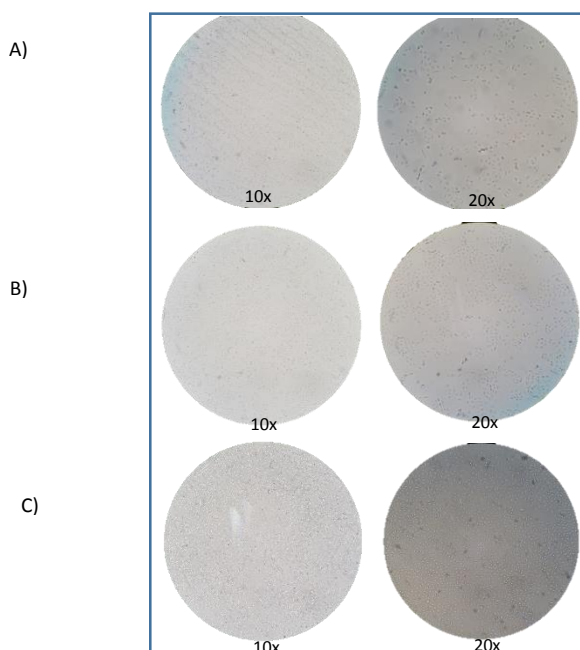


Figura 1.- Subcultivo de células MA-104. A) 24 horas de incubación B) 48 horas de incubación. C) 72 horas de incubación.

2. Propagación de la cepa de rotavirus Wa en células MA-104

Se utilizó la cepa de referencia de rotavirus Wa (G1P[8]) para los ensayos de actividad antiviral, la amplificación de los genes de las proteínas NSP2 y NSP5, y en la evaluación de los efectos de los extractos en la expresión del interferón- β . Las células MA-104 se infectaron con lisados correspondientes y se realizó la titulación de focos infecciosos con inmunoperoxidasa. Se trabajó con la dilución 1:16 para ajustar el lisado a una MOI de 0.1 (Fig. 2).

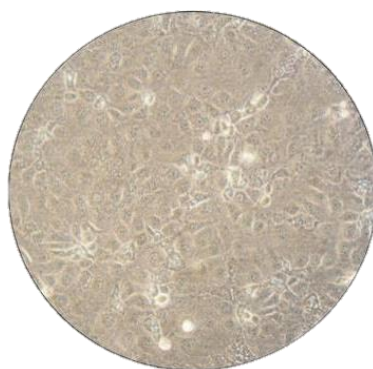


Figura 2.- Infección de Rotavirus Wa 24 horas

3. Extracción de extractos de plantas acuosos e hidro-etanólicos

Se adquirieron las plantas a analizar de *Allium sp.* vaina y semillas de *Prosopis sp.* y cascara de *Musa sp.* para obtener los extractos. Estas con antecedentes para tratar desordenes digestivos como diarreas bacterianas principalmente.

Las plantas fueron utilizadas para obtener los extractos con un volumen final de extracción de 500 ml. Una vez pesados los liofilizados se obtuvieron rendimientos diferentes (Tabla 1). Se observó que la presencia del etanol en la extracción y el método utilizado mostró un mayor rendimiento en cuanto al peso recuperado de los extractos de *Allium sp.* y *Prosopis sp.* a diferencia de los extractos de *Musa sp.* (Fig. 3).

Tabla 1.- Rendimiento en peso de extractos de plantas liofilizados

Nombre común	Nombre científico	Recuperación (gr)	
		Acuoso	Hidro-etanólico
Ajo	<i>Allium sp.</i>	29.3	30.3
Cascara de Banana	<i>Musa sp.</i>	6.5	3.5
Vaina de mezquite	<i>Prosopis sp.</i>	5.8	7.3

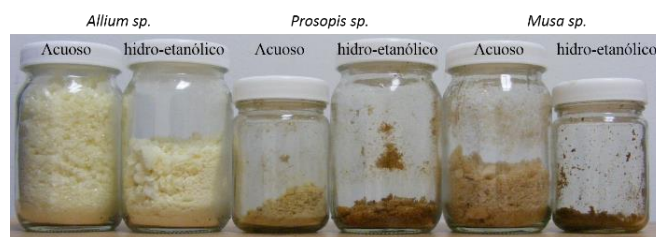


Figura 3.- Extractos acuosos e hidro-etanólicos liofilizados

4. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de plantas

La actividad citotóxica de los extractos acuosos e hidro-etanólicos fue evaluada *in vitro* sobre células MA-104. Las concentraciones utilizadas de cada extracto se realizaron con diluciones seriadas partiendo de 5 mg/ml a 0.01 mg/ml con un tiempo de exposición de 24 horas, cada ensayo se realizó por triplicado. Además, se analizó el desarrollo y la morfología de la monocapa celular para cada concentración de extracto mediante la observación microscópica. Todos los extractos generaron un efecto citotóxico en las células a concentraciones de 5 mg/ml la cual no permitió la confluencia completa de los cultivos. Las concentraciones bajo las cuales las células continuaron su proliferación normal y lograron un desarrollo de la monocapa similar al control fueron a partir de 2.5-0.01 mg/ml para *Allium sp.* y *Prosopis sp.* (Fig. 4 y 5), mientras que el extracto de *Musa* fue el más citotóxico ya que a concentraciones de 1.5 mg/ml aun fue visible el efecto citopático sobre la monocapa celular. La concentración de 0.62 mg/ml e inferiores a esta mostraron un crecimiento normal respecto al control (Fig. 6).

Los resultados obtenidos por el método de MTT que permite evaluar la funcionalidad mitocondrial, fueron muy similares a la observación microscopica. La toxicidad entre los extractos acuosos como hidro-etanólicos sobre las células MA-104 fue muy semejante. Fue posible determinar las concentraciones no citotóxicas en donde los cultivos que bajo el tratamiento mostraron una viabilidad del 100% respecto a la absorbancia del control.

Las concentraciones de los extractos que no alteraron el crecimiento del cultivo celular fueron 2.5-0.01mg/ml para *Allium sp.* y *Prosopis sp.* (Fig. 7 y 8).

La citotoxicidad fue más visible para los extractos de *Musa sp.* Las concentraciones que provocaron una reducción de la viabilidad celular fueron 5-1.5 mg/ml respecto al control. En cambio, las concentraciones del extracto de *Musa sp.* que permitieron una viabilidad del 100% fueron de 0.62-0.01mg/ml (Fig. 9).

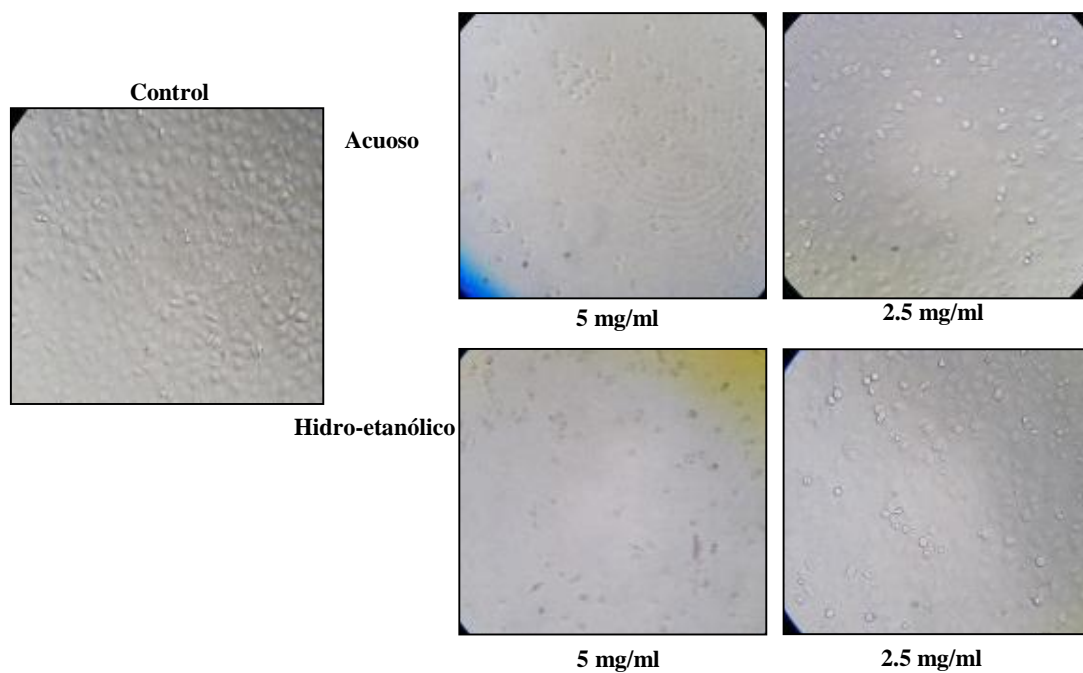


Figura 4.- Efecto citotóxico del extracto de *Allium sp.* sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.

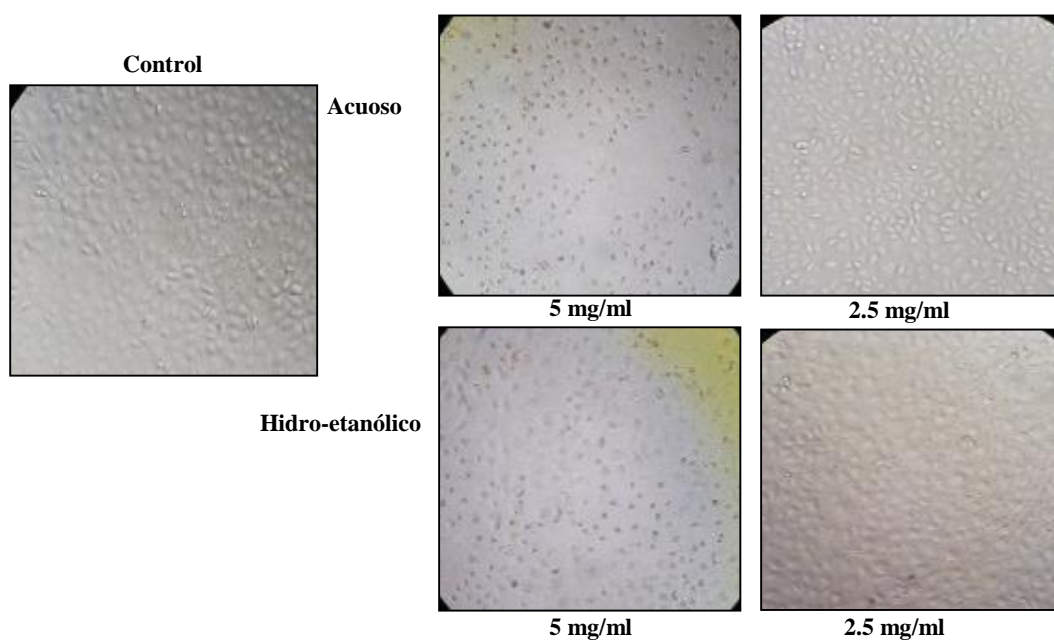


Figura 5.- Efecto citotóxico del extracto de *Prosopis sp.* sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.

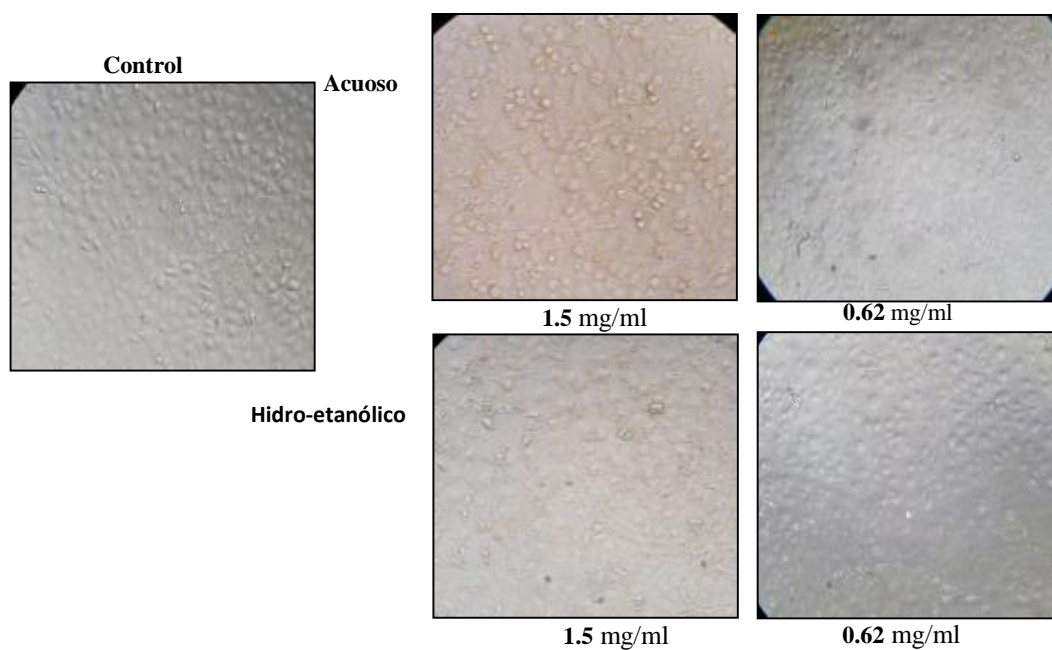


Figura 6.- Efecto citotóxico del extracto de *Musa sp.* sobre células MA-104 por observación microscópica 20X.

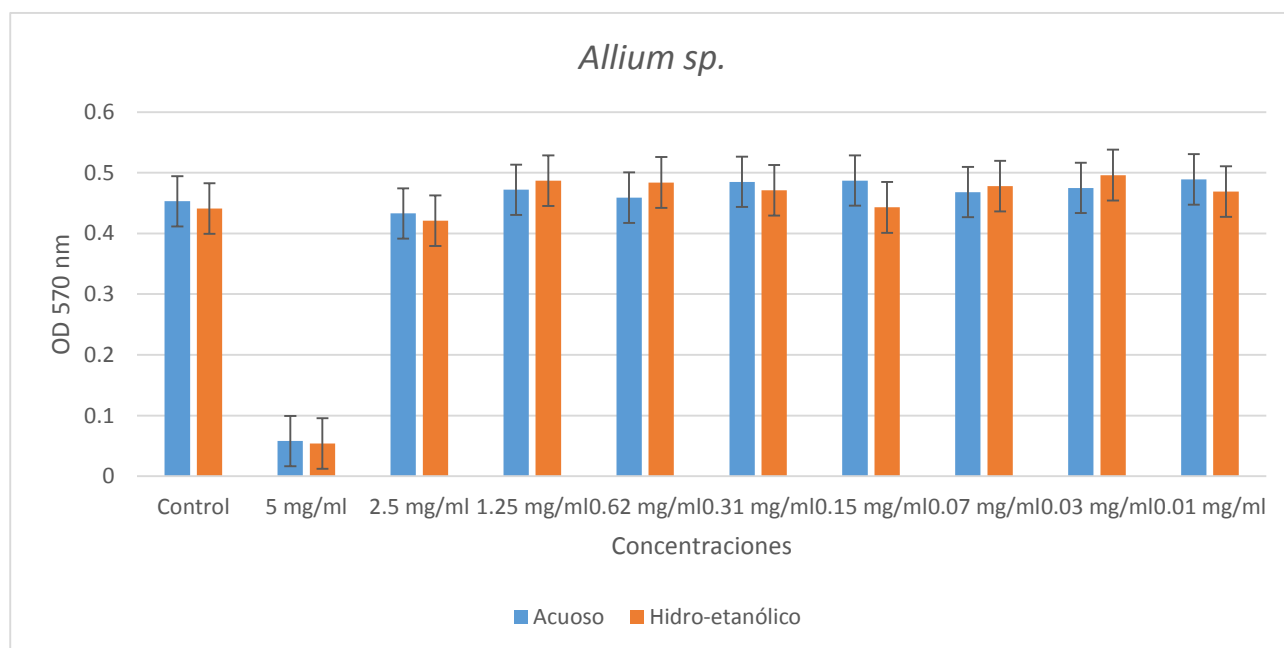


Figura 7.- Efecto citotóxico de los extractos de *Allium sp.* sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.

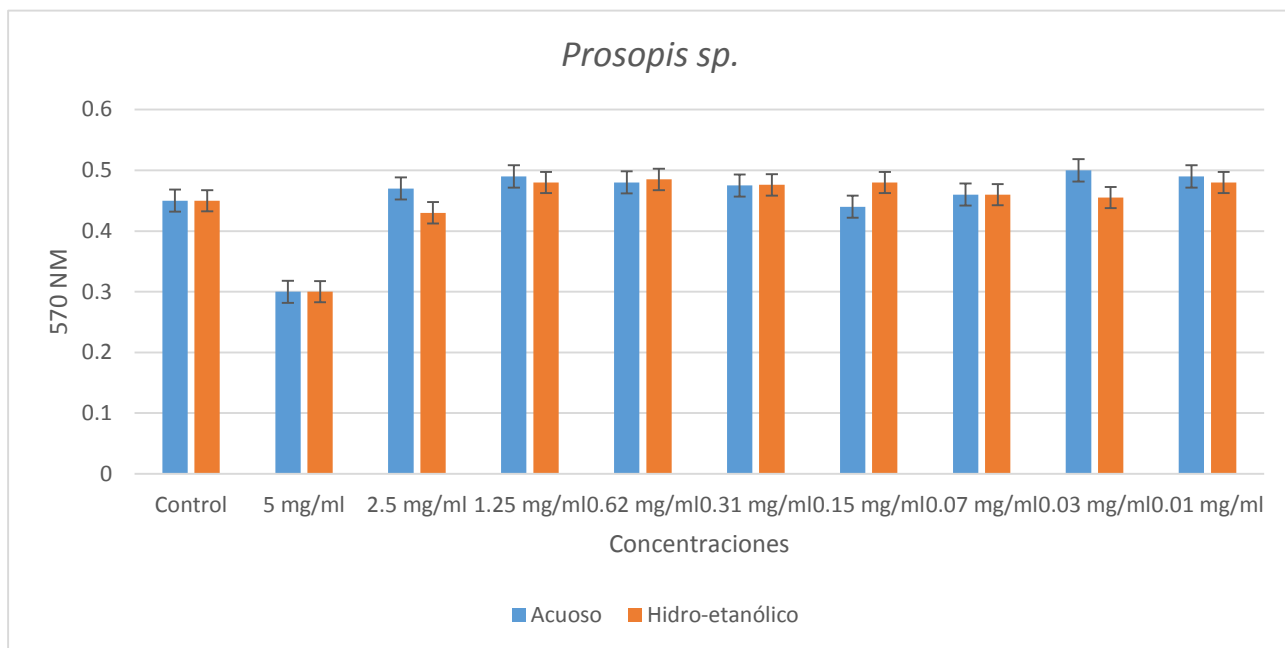


Figura 8.- Efecto citotóxico de los extractos de *Prosopis sp.* sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.

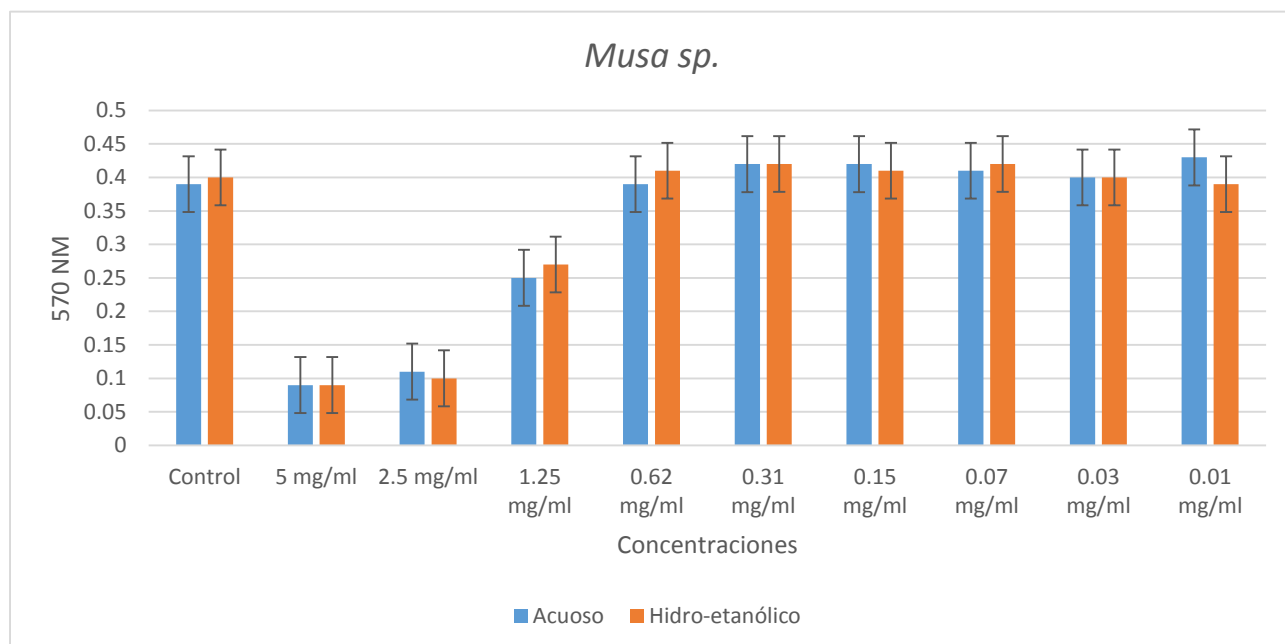


Figura 9.- Efecto citotóxico de los extractos de *Musa sp.* sobre células MA-104 por el método de viabilidad celular por el método de MTT.

Todas las concentraciones que mostraron el 100% de viabilidad respecto al control fueron consideradas como concentraciones de trabajo para evaluar su posible actividad antiviral.

5. Evaluación de la actividad antiviral de los extractos de plantas

Se realizaron ensayos de actividad antiviral utilizando la técnica de tinción de focos infecciosos teñidos con la técnica de inmunoperoxidasa en dos eventos distintos; 1) Incubación virus-extracto previo a la infección, 2) Tratamiento a las células con extractos después de la infección viral.

Una vez cuantificados y promediados los focos infecciosos producidos en cada ensayo, se determinaron las concentraciones antivirales. Los mayores porcentajes de inhibición se presentaron al incubar los extractos con el virus antes de la infección celular, ambos tipos de extractos (acuosos e hidro-etanólicos) de *Allium sp.* mostraron una reducción de focos infecciosos del 100% bajo las concentraciones de 5-0.62 mg/ml (Fig. 10). Las concentraciones de 0.31-0.01 mg/ml mantuvieron una inhibición de focos infecciosos del 60% (Fig. 11). Los mejores resultados del extracto de *Prosopis sp.* mostraron una reducción del 55-60% a concentraciones de 2.5-0.62% (Fig. 12 y 13).

Bajo este ensayo, la mayor actividad antiviral se presentó en el extracto hidro-etanólico de *Musa sp.* con una reducción de focos infecciosos del 100-80% en concentraciones de 0.62-0.01 mg/ml y de un 100-40% para el extracto acuoso (Fig. 14 y 15).

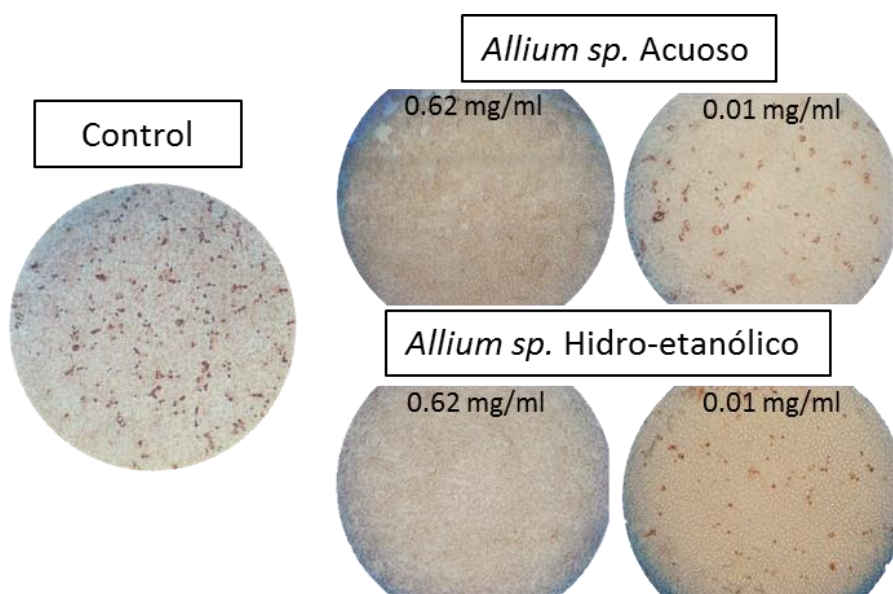


Figura 10.- Actividad antiviral de extractos de *Allium sp.* contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.

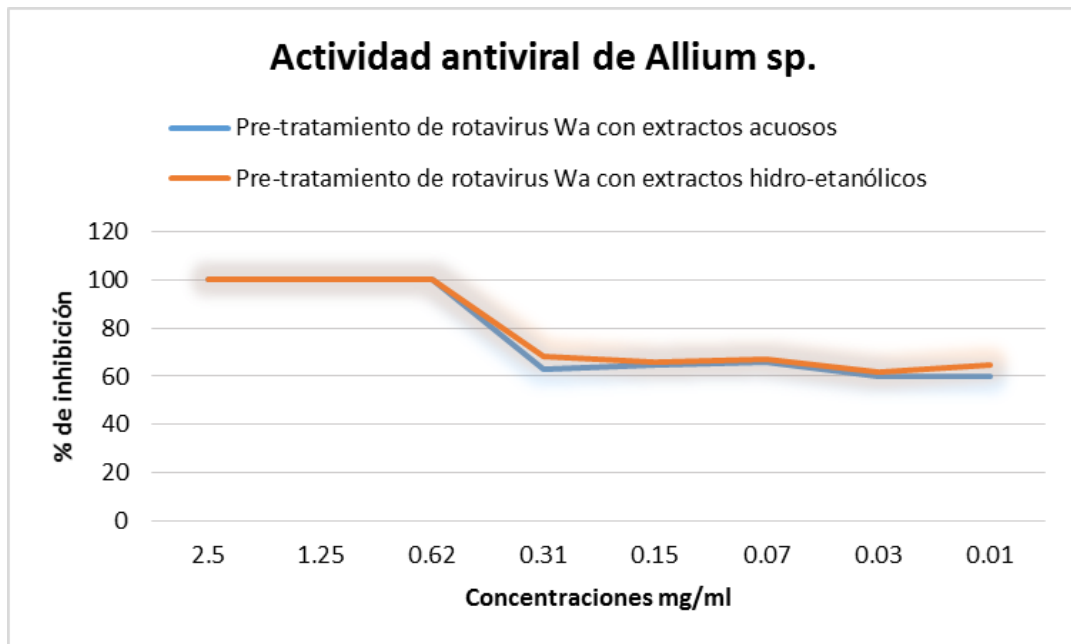


Figura 11.- Actividad antiviral del extracto acuosos e hidro-etanólicos de *Allium* sp.

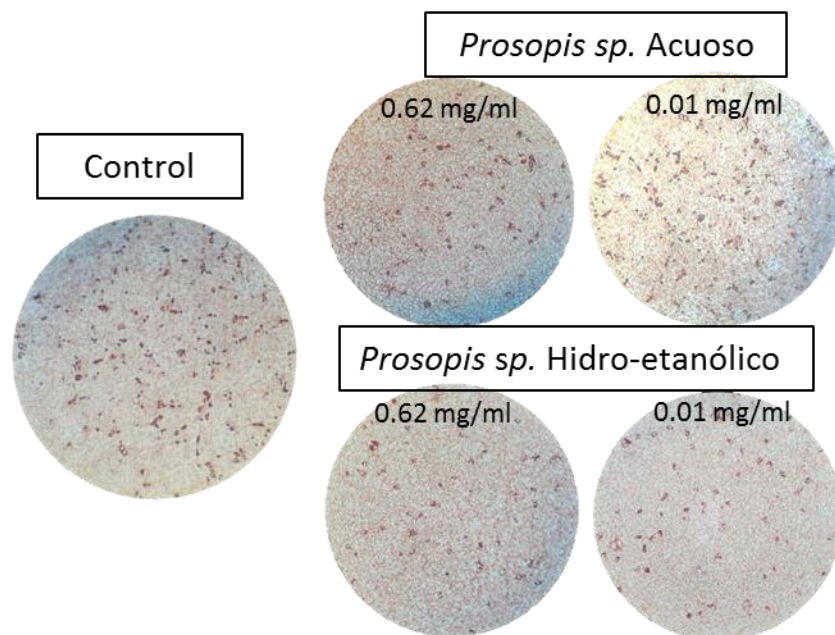


Figura 12.- Actividad antiviral de extractos de *Prosopis* sp. contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.

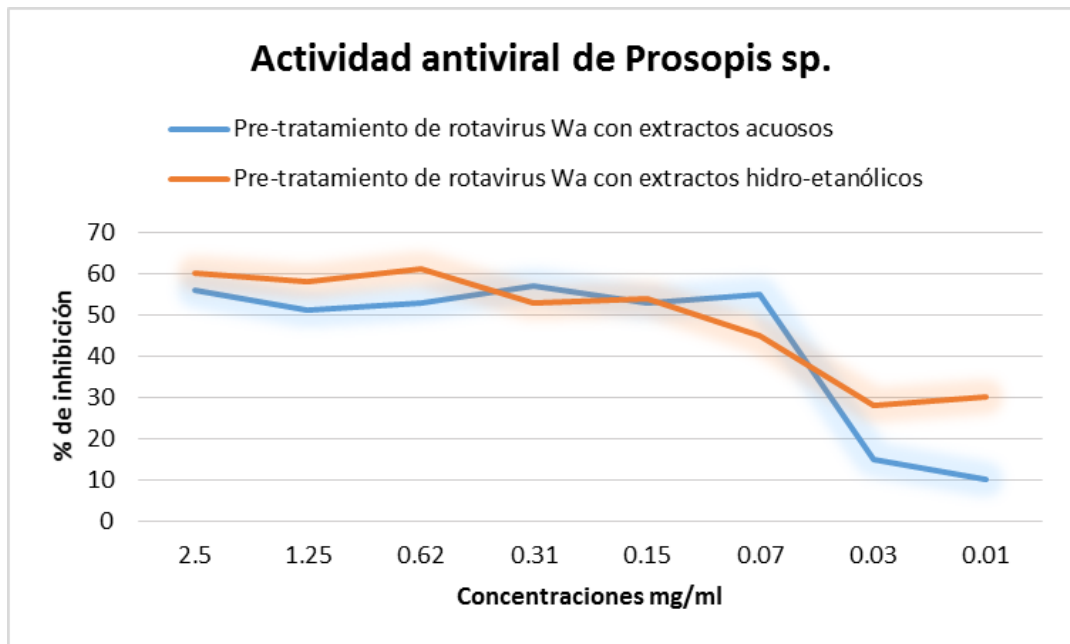


Figura 13.- Actividad antiviral del extracto acuosos e hidro-etanólicos de *Prosopis* sp.

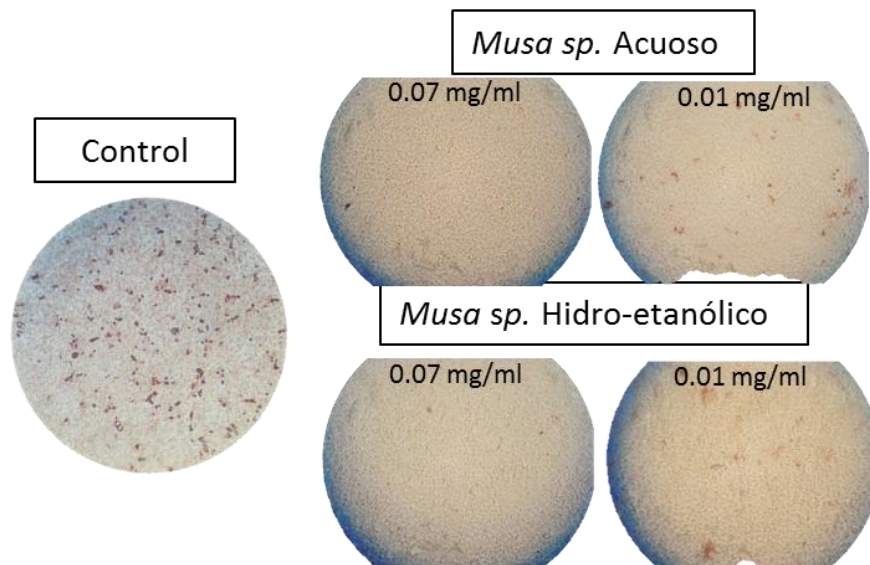


Figura 14.- Actividad antiviral de extractos de *Musa* sp. contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación virus-extracto previo a la infección.

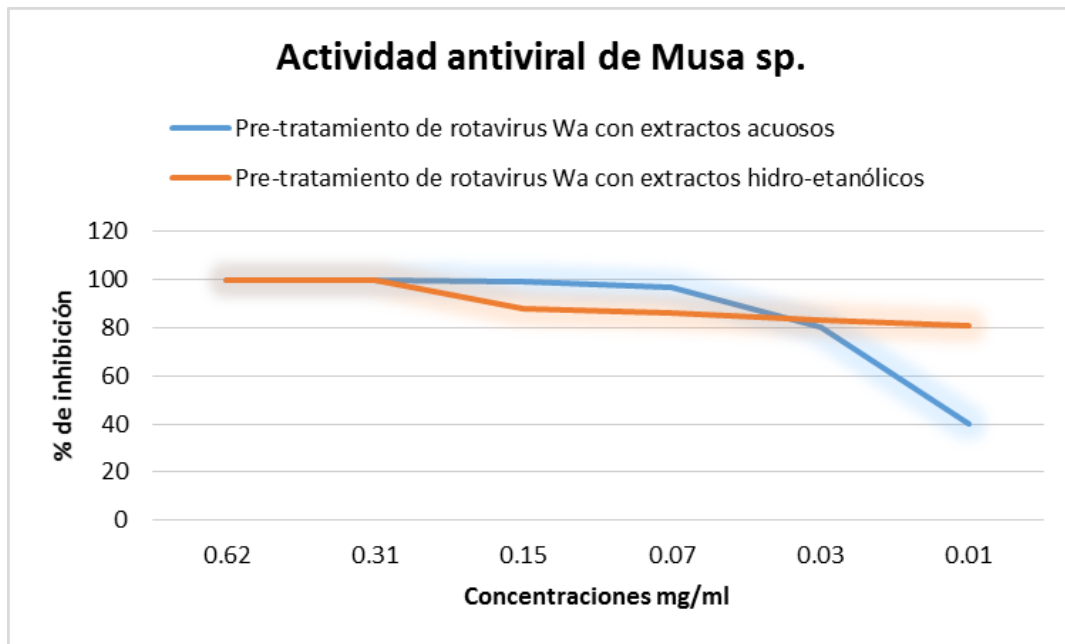


Figura 15.- Actividad antiviral del extracto acuosos e hidro-etanólicos de *Musa sp.*

Cuando las células fueron tratadas después de la infección con rotavirus, bajo este ensayo los extractos permitieron la progresión de la infección mostrando una baja actividad antiviral, Los resultados del extracto de *Allium sp.* fue de una reducción de focos de un 98-60% a concentraciones de 2.5-0.62 mg/ml del extracto acuoso y de un 75-59% con el extracto hidro-etanólico (Fig. 16 y 17). Los mejores resultados con extracto de *Prosopis sp.* se observaron cuando las células fueron tratadas después de la infección con rotavirus, el extracto acuoso mostró una reducción del 96% y el hidro-etanólico un 67% a concentraciones de 1.25 mg/ml (Fig. 18 y 19).

La concentración más efectiva del extracto de *Musa sp.* fue de 0.62 mg/ml con una reducción del 65% en el extracto acuoso y un 60% para el extracto hidro-etanólico (Fig 20 y 21).

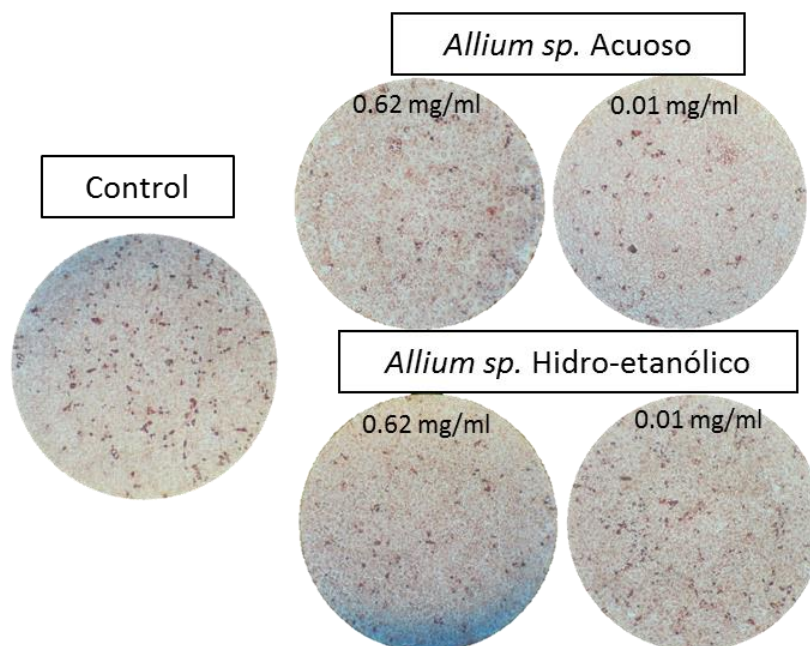


Figura 16.- Actividad antiviral del extracto de *Allium sp.* contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección.

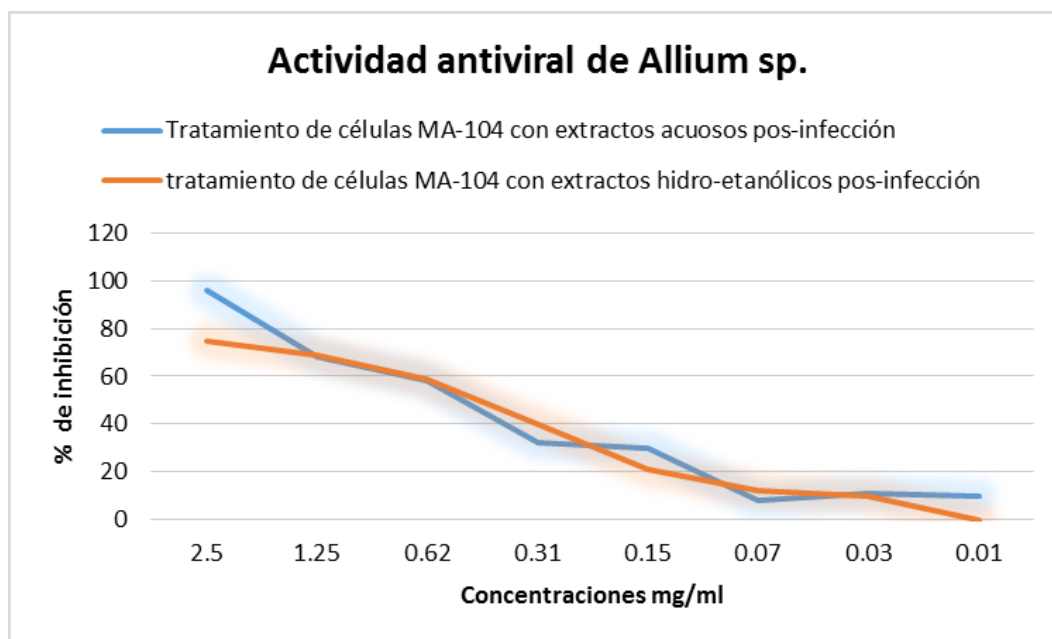


Figura 17.- Actividad antiviral del extracto acuosos e hidro-etanólicos de *Allium sp.*

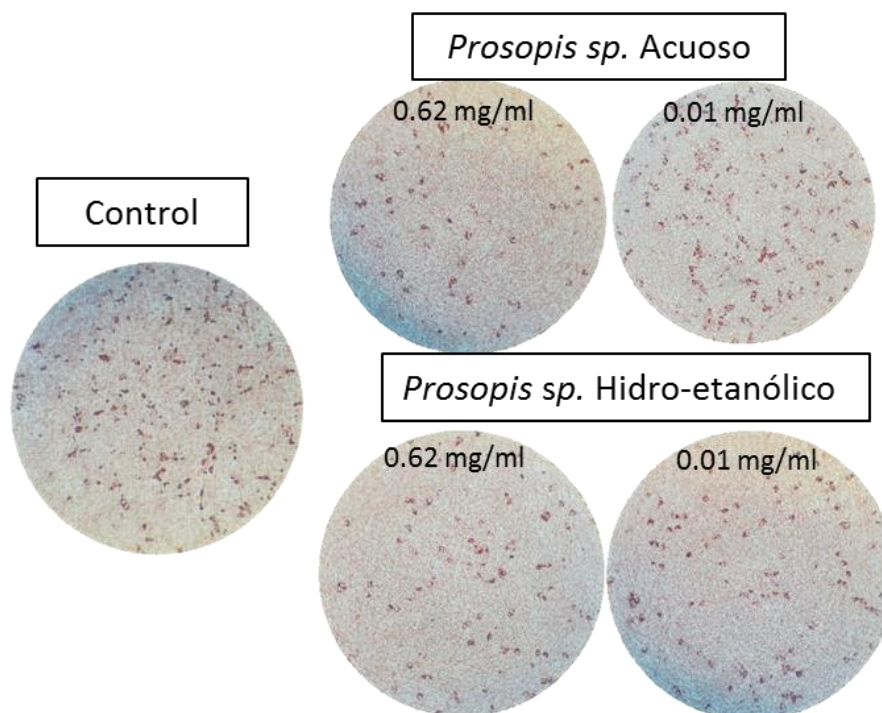


Figura 18.- Actividad antiviral del extracto de *Prosopis sp.* contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección.

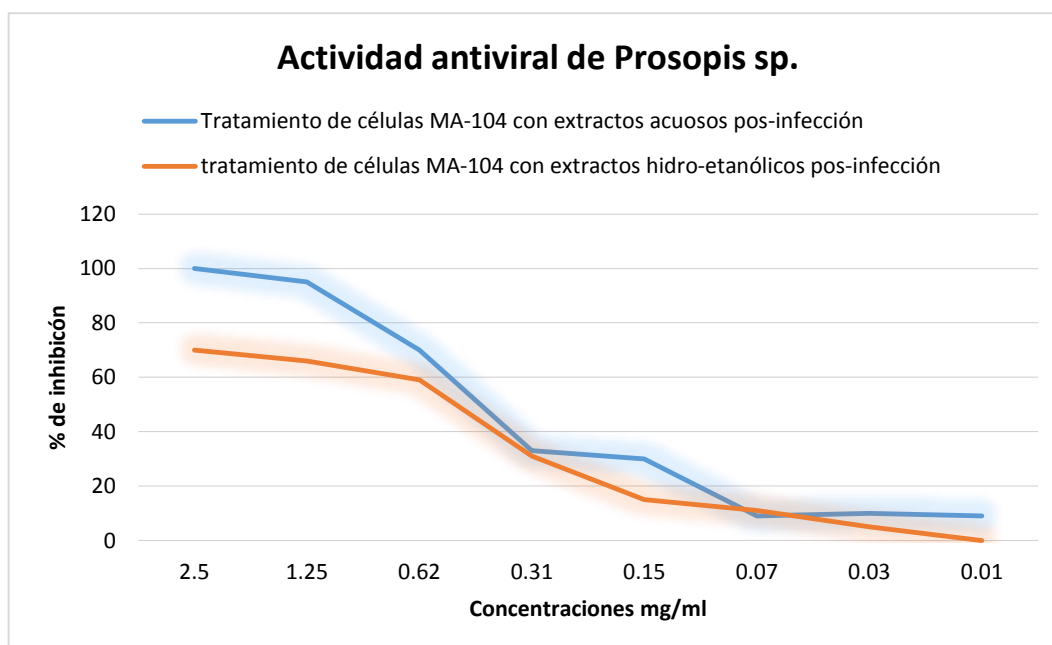


Figura 19.- Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólicos de *Prosopis sp.*

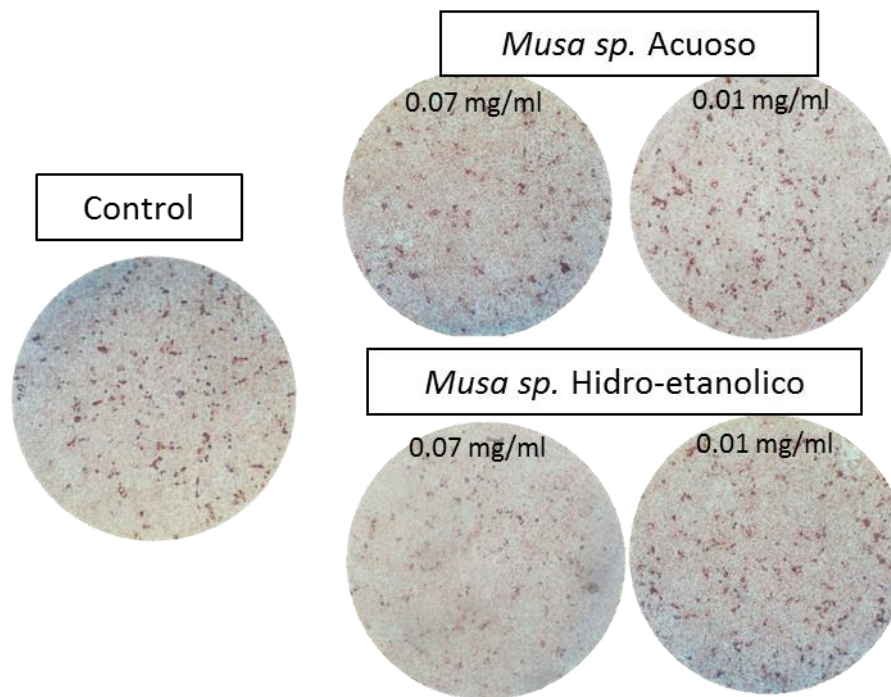


Figura 20.- Actividad antiviral del extracto de *Musa sp.* contra rotavirus por tinción de focos infecciosos. Incubación del extracto post-infección.

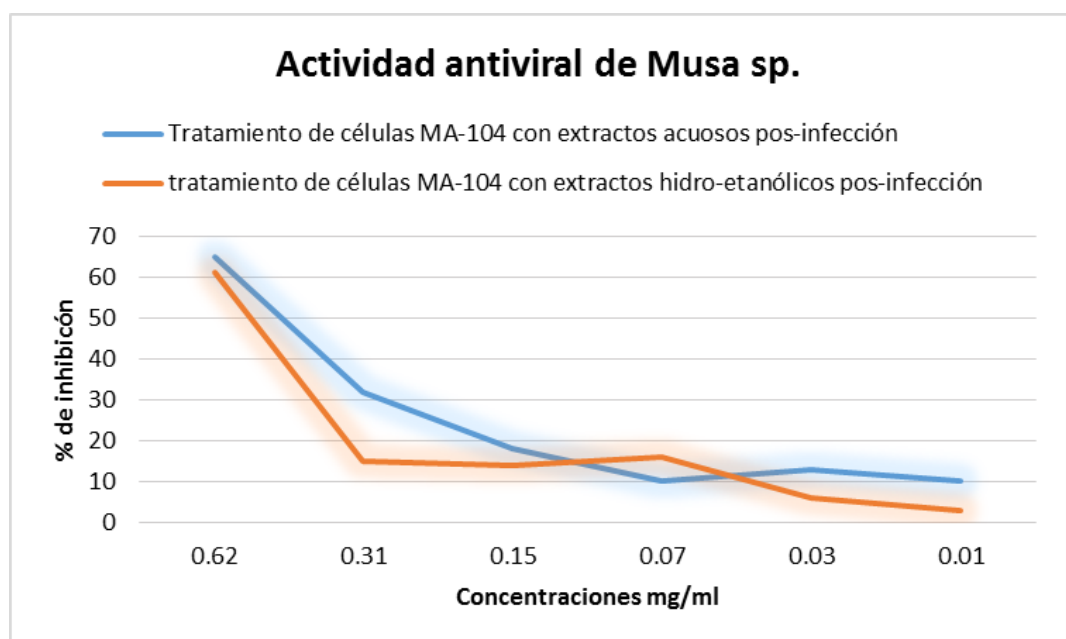


Figura 21.- Actividad antiviral del extracto acuoso e hidro-etanólico de *Allium sp.*

6. Efecto de los extractos en la expresión de los genes de las proteínas virales NSP2 y NSP5

El análisis molecular de la expresión de los genes 8 y 11 (NSP2 y NSP5) de rotavirus, se realizó densitométricamente, mediante la captura de una imagen digital del gel de poliacrilamida (Fig. 22) y el procesamiento de la imagen para determinar las áreas de la banda y analizar automáticamente la densidad utilizando el programa imagenj 1.45k.

Los resultados sobre la detección de NSP2 mostraron que tanto extractos acuosos como hidro-etanólicos de *Musa sp.* y *Allium sp.* (0.31mg/ml) presentaron un porcentaje de reducción de expresión por arriba del 94% respecto al control, siendo el extracto de *Musa sp.* (0.31mg/ml) con mejor actividad quien presentó un porcentaje de reducción del 99%. En cambio, el extracto hidro-etanólico de *Prosopis sp.* fué el que mostro una actividad más baja con un porcentaje de reducción del 74% (Fig. 23).

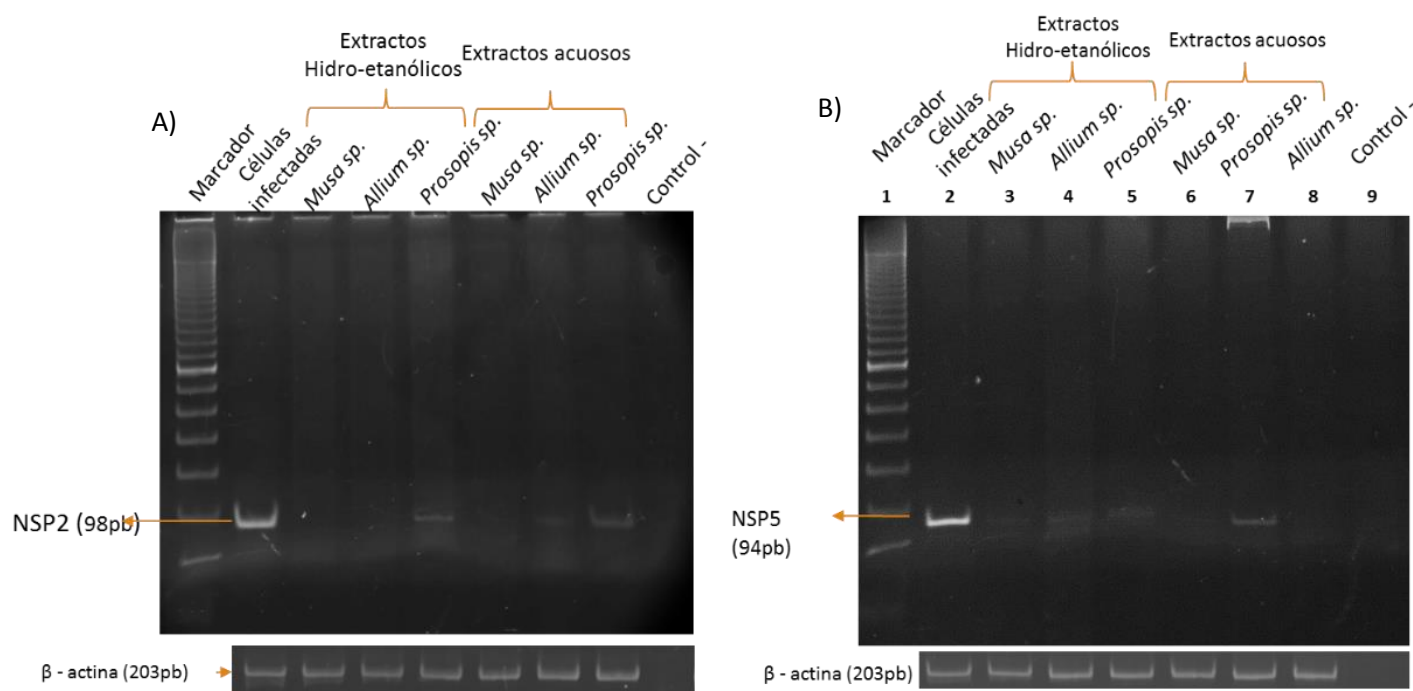
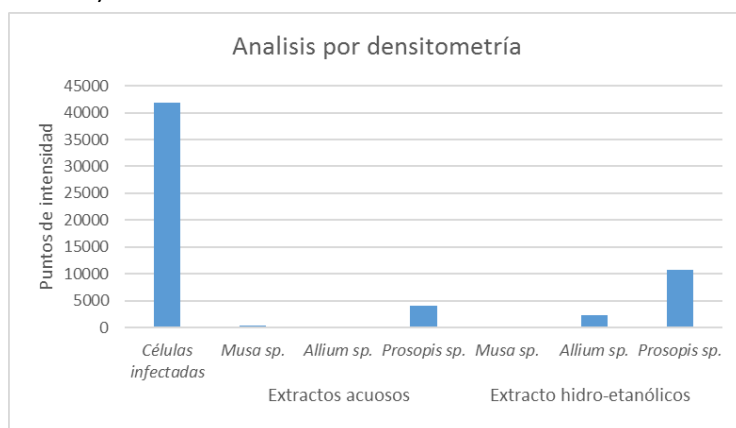


Figura 22.- Detección de los genes virales. A) productos de amplificación de la PCR del gen NSP2. B) producto de amplificación de la PCR del gen NSP5.

A)



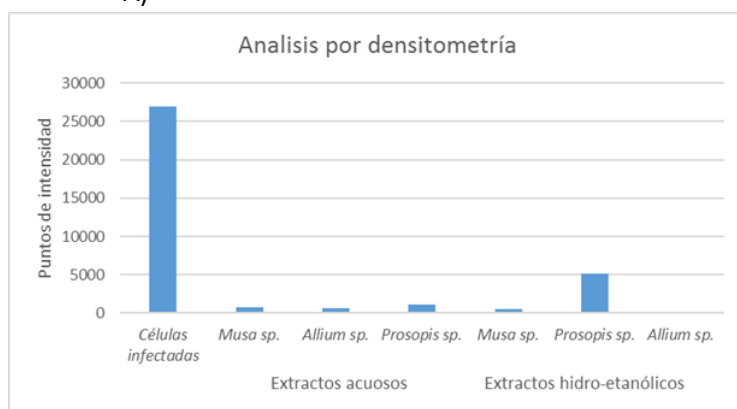
B)

	Células con tratamientos	% de reducción de expresión
	Células infectadas	-
Extractos acuosos	<i>Musa sp.</i>	99.4
	<i>Allium sp.</i>	99.4
	<i>Prosopis sp.</i>	90.1
Extractos hidro-etanólicos	<i>Musa sp.</i>	99.4
	<i>Allium sp.</i>	94.4
	<i>Prosopis sp.</i>	74.2

Figura 23.- Análisis de expresión por densitometría. A) análisis de expresión de NSP2 por densitometría. B) Porcentaje de reducción de expresión de NSP2.

Eventos similares se mostraron en la detección del gen de NSP5, los mejores resultados se observaron en los extractos de *Musa sp.* y *Allium sp.* (0.31mg/ml) con porcentajes de reducción por arriba del 97%. El virus que fué pre-tratado con el extracto acuoso de *Prosopis sp.* (0.31mg/ml) antes de la infección fué posible visualizar la banda del amplicon del gen 11 con mayor intensidad (Fig. 24).

A)



B)

	Células con tratamientos	% de reducción de expresión
	Células infectadas	-
Extractos hidro-etanólicos	<i>Musa sp.</i>	97
	<i>Allium sp.</i>	97.7
	<i>Prosopis sp.</i>	97.2
Extractos acuosos	<i>Musa sp.</i>	98
	<i>Prosopis sp.</i>	80.8
	<i>Allium sp.</i>	99.3

Figura 24.- Análisis de expresión por densitometría. A) análisis de expresión de NSP5 por densitometría. B) Porcentaje de reducción de expresión de NSP5.

7.- Efecto de los extractos en la expresión de IFN- β por RT-PCR

El análisis de expresión de IFN- β se realizó por densitometría usando el programa imagen 1.45k, mediante la captura de una imagen digital y el procesamiento de la imagen para determinar las áreas de la banda y analizar automáticamente la densidad.

El resultado de los extractos sobre la expresión del IFN- β mostró, que los extractos a concentraciones de 0.31 mg/ml generaron un efecto pro-inflamatorio a las células MA-104 estimulando la producción de IFN- β . Ya que fué posible la visualización de los amplicones utilizando oligonucleótidos específicos para dicho gen (Fig. 25).

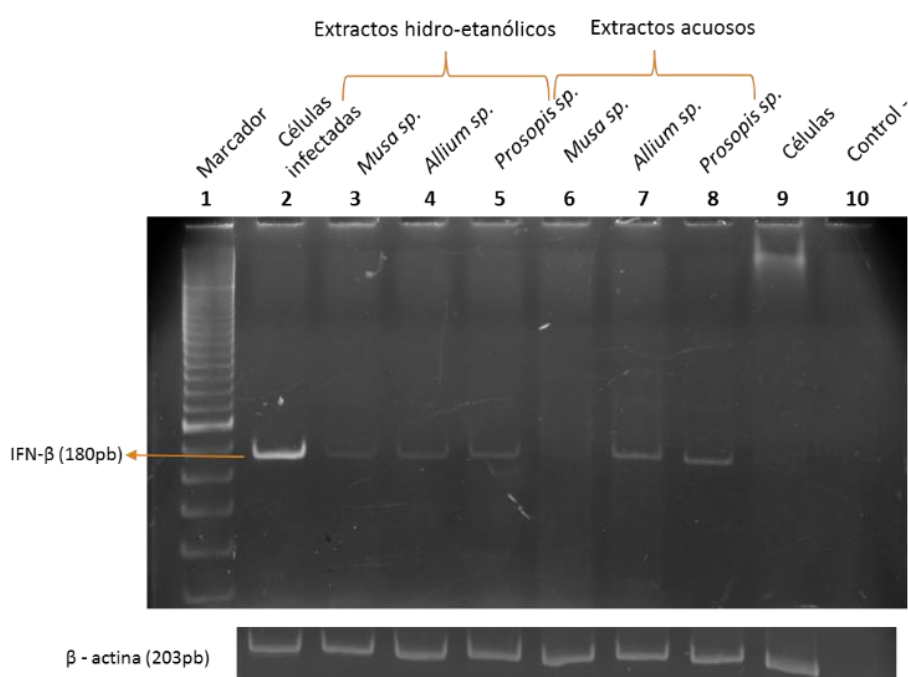


Figura 25.- Efecto de los extractos de plantas acuosos e hidro-etanólico (0.31mg/ml) sobre la expresión de Interferón- β .

Se realizó una curva de expresión del interferón durante cuatro diferentes horas pos-infección con rotavirus Wa usando una MOI de 1, en estos resultados se observó a las 8 horas el punto más alto de expresión, y a las 12 horas de infección se observó una ligera disminución, esto de acuerdo a la intensidad de las bandas analizadas por densitometría. De igual forma se analizó la expresión del IFN- β incubando el extracto hidro-etanólico de *Musa sp.* (0.31mg/ml) durante cuatro períodos distintos, en donde se observó una expresión similar respecto al tiempo de incubación (Fig. 26).

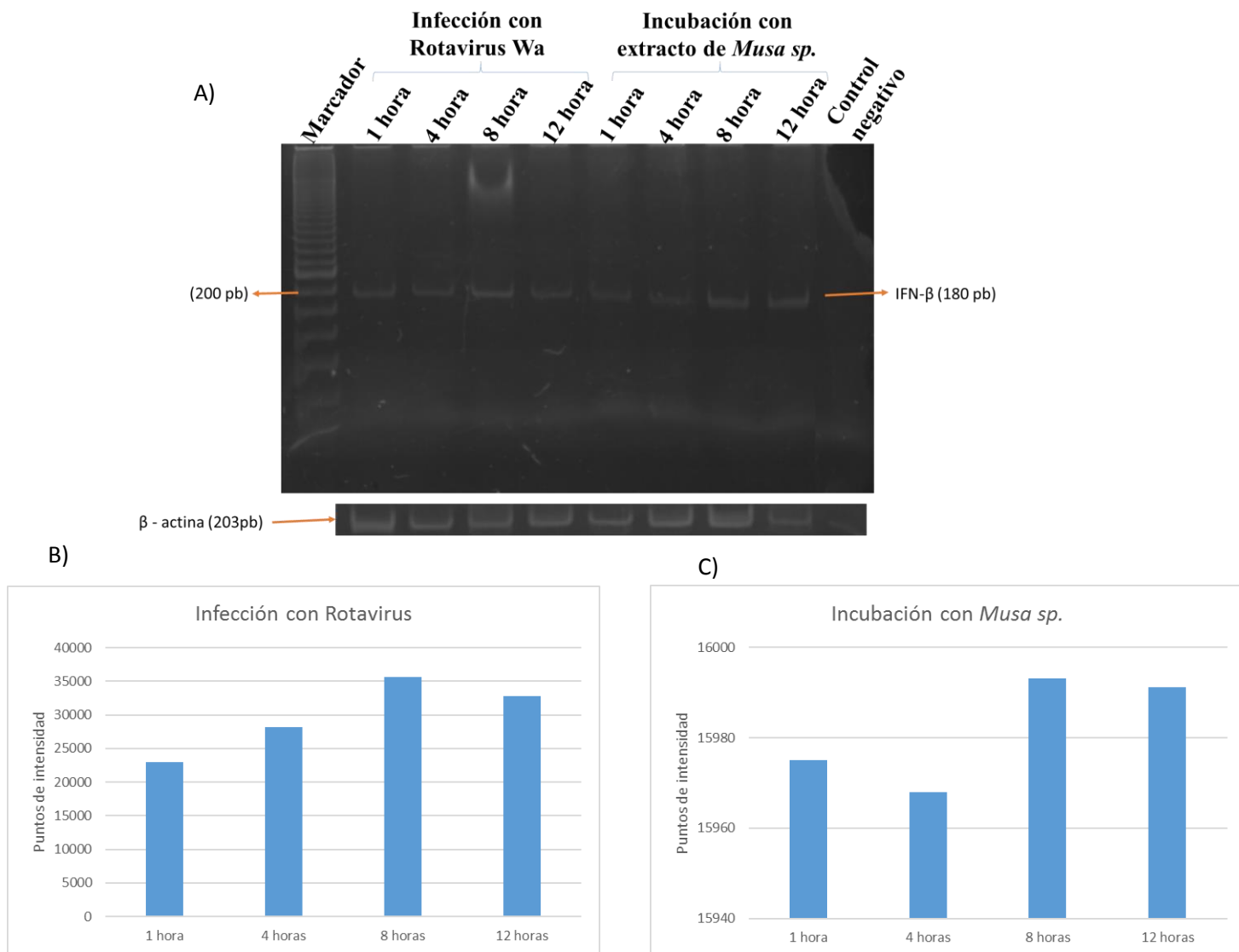


Figura 26.- Detección del Interferón durante diferentes tiempos. A) Productos de amplificación del gen del IFN-β B) Análisis de expresión del IFN- β por densitometría a diferentes tiempos en una infección por rotavirus (MOI 1). C) Análisis de expresión por densitometría del extracto hidro-etanólico de *Musa sp.* (0.31mg/ml) a diferentes tiempos de incubación.

DISCUSIÓN

Las infecciones virales son la causa de muchas enfermedades humanas que significan un impacto de mortalidad importante. El descubrimiento y desarrollo de agentes antivirales eficaces es una tarea difícil, la limitada disponibilidad de medicamentos antivirales podría atribuirse en mayor parte a la dificultad de encontrar dianas para fármacos que eliminen el virus sin dañar a la célula huésped (Ian Cock 2010).

Los productos naturales a partir de plantas representan un recurso casi inagotable de compuestos potencialmente antivirales. Varios compuestos naturales incluyendo polisacáridos, flavonoides, terpenos, alcaloides y fenoles aislados de plantas usadas en la medicina tradicional muestran actividad antiviral, estos compuestos pueden estar involucrados en la defensa de las plantas contra distintos patógenos (Palombo 2006; Cecílio, de Faria et al. 2012).

En el presente estudio, se realizaron extractos acuosos e hidro-etanólicos de las plantas *Musa sp.*, *Allium sp.* y *Prosopis sp.*, tradicionalmente usadas para tratar desordenes intestinales. Uno de los objetivos fue evaluar la potencial actividad antiviral de los extractos contra rotavirus, para este fin se emplearon células MA-104 (células epiteliales embrionarias de riñón de mono verde africano), dichas células son ampliamente utilizadas como modelo para estudiar diferentes cepas de rotavirus (Paul Offit 1983), y la cepa de rotavirus Wa con genotipo (G1P[8]), un virus bien caracterizado y de las principales cepas de referencia utilizadas.

Para determinar la actividad antiviral se utilizó la técnica de tinción de focos infecciosos y una multiplicidad de infección de 0.1, misma que ha sido reportada como óptima para obtener títulos virales altos de rotavirus Wa sobre células MA-104. (Paul Offit 1983). esta técnica ya ha sido utilizada para la detección de diferentes cepas de rotavirus (Cevenini 1984).

En la preparación de los extractos acuosos e hidro-etanólicos se empleó para *Allium sp.* “el diente” de ajo sin la envoltura que lo recubre, se utilizó la vaina y semillas para *Prosopis sp.* y la cáscara de la banana para *Musa sp.* Estos métodos de extracción

fueron elegidos debido a que numerosos estudios han reportado efectos antimicrobianos y terapéuticos utilizando extracciones con agua, etanol, o bien extractos hidro-etanólicos (Nidia Rojas 2010), además, la gran mayoría de las afecciones reportadas que son tradicionalmente tratadas con estas plantas se usan en forma de decocciones o infusiones a base de agua. El rendimiento de extracción en cuanto al peso recuperado fue mayor con la presencia del etanol en los extractos de *Allium sp.* y *Prosopis sp.* a diferencia del extracto de *Musa sp.* que fue superior lo recolectado en gramos con el solvente acuoso, esto presupone una diferencia en la composición química de la planta y la respuesta de la mismas a las soluciones utilizadas.

Los extractos crudos fueron liofilizados y resuspendidos en medio MEM a concentración final de 5 mg/ml (Stock). La citotoxicidad de cada extracto se hizo realizando diluciones seriadas hasta 0.01 mg/ml sobre las células MA-104.

En general los extractos mostraron baja citotoxicidad. La toxicidad fue más visible en los extractos de *Musa sp.* que sólo a concentraciones inferiores de 0.62 mg/ml permitieron una viabilidad del 100%. Además, no se observó diferencia significativa de citotoxicidad entre los extractos acuosos e hidro-etanólico de los extractos de las 3 plantas en los estudios *in vitro*. Sin embargo, no todos los extractos fueron capaces de inhibir la replicación viral.

Nuestros resultados mostraron una actividad superior en la reducción de focos infecciosos cuando el virus fue pre-incubado con el extracto antes de la infección, así mismo, los mayores porcentajes de inhibición se presentaron en los extractos de *Musa sp.*, con una actividad del 100-60% en concentraciones de 0.62-0.01mg/ml para el extracto acuoso y de un 100-80% en los extractos hidro-etanólicos a las mismas concentraciones.

Por otra parte, rotavirus es totalmente dependiente de la interacción entre NSP2 y NSP5 para la formación de viroplasma (Carreño-Torres, Gutiérrez et al. 2010), en los resultados aquí descritos sobre la expresión de los genes virales de las proteínas NSP2 y NSP5 por RT-PCR, se observa una mayor reducción en la detección del gen NSP2, en los extractos acuosos de *Allium* y *Prosopis* en comparación con los hidro-etanólicos a

concentraciones de 0.31 mg/ml. Los extractos acuosos e hidro-etanólicos de *Musa* mostraron un porcentaje de reducción de expresión similar del gen viral NSP2, de un 99% a 0.31 mg/ml. Y una reducción de expresión de NSP5 de un 97% para los extractos hidro-etanólicos de *Allium*, *Prosopis* y *Musa*. Eichwald *et al.* reportó que con la ausencia de cualquiera de estas proteínas se interrumpe la formación de viroplasmas, inhibiéndose la progresión del ciclo replicativo de rotavirus (Eichwald, Rodriguez et al. 2004).

Concentraciones similares a las nuestras de extractos de *Musa* y *Allium* han sido reportadas con actividad antiviral. Cheung *et al.* reportó que la lectina aislada de *M. acuminata* fue capaz de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa de VIH-1 con una IC₅₀ de 10 µg/ml (Cheung, Wong et al. 2009). Así mismo, estudios realizados con extractos de *A. sativum* mostraron actividad antiviral *in vitro* contra el virus herpes simple e influenza tipo B, en el cual se determinó que concentraciones de 150 µg/ml redujo significativamente el título de infectividad de estos virus (Tsai, Cole et al. 1985). Además, también se ha reportado actividad antiviral contra virus como citomegalovirus y rinovirus humano tipo 2 (Majewski 2014).

El ajo es uno de los condimentos más utilizados y ha sido usado durante mucho tiempo con propósitos curativos, Arreola, *et al* 2015. Ha propuesto como candidato prometedor para el mantenimiento del homeostasis del sistema inmune al ajo y sus derivados. El ajo parece mejorar el funcionamiento del sistema inmune mediante la estimulación de ciertos tipos de células, tales como macrófagos, linfocitos, NK, células dendríticas y eosinófilos, por mecanismos que incluyen la modulación de la secreción de citocinas (Rodrigo Arreola 2015).

Otros estudios realizados en ratones han demostrado que el trisulfuro de dialilo (DATS) también conocido como allitridin extraído del ajo, pueden mejorar la respuesta inmune antiviral, en murinos infectados con citomegalovirus (MCMV). La allitridin reguló la expresión de IFN-γ lo que debió mejorar las reacciones inmunes celulares específicas contra CMV (Rodrigo Arreola 2015).

La lectina aislada de *Musa sp.* fue capaz de provocar una respuesta mitogénica en esplenocitos murinos, y la inducción de la expresión de citocinas como Interferon-γ,

TNF- α y la interleucina-2, y un aumento en la proliferación de linfocitos T (Cheung, Wong et al. 2009). Stojanovic et al propone que la lectina de *Musa* se pueda desarrollar como un anti-viral por su antecedente de inhibir el ciclo replicativo de VIH y como un agente inmunopotenciador (Stojanović 2010).

Min Hwa et al. Mostró el mecanismo protector de extractos sobre infecciones virales por calicivirus felino (FCV), utilizando ginseng rojo coreano (GRK). Células CRFK fueron pre-tratadas con 10 μ g/ml de GRK. Se midió la expresión de interferones de tipo 1 por RT-qPCR. La inducción de citocinas antivirales fueron más altos en comparación de las células infectadas con FCV, estas contribuyeron a la reducción del título viral (Lee, Seo et al. 2014).

En este estudio extractos de *Musa sp*, *Allium sp*. y *Prosopis sp*. generaron un efecto pro-inflamatorio induciendo la expresión de IFN- β en células MA-104.

Se observó que en una infección por rotavirus la expresión del IFN- β disminuyó a las 12 horas, esto debido quizás a los mecanismos de evasión del sistema inmune que rotavirus posee por acción de la proteína NSP1 (Barro and Patton 2007). En cambio, las células tratadas con el extracto hidro-etanólico de *Musa* (0.31 mg/ml) mantuvo una expresión constante durante el mismo periodo de tiempo. dicha modulación puede proporcionar un mecanismo de acción para sus efectos terapéuticos, incluyendo la estimulación del primer mecanismo de defensa inmune representado por la inmunidad innata.

CONCLUSIÓN

Las células MA-14 mostraron una sensibilidad similar a los extractos acuosos e hidro-etanólicos de *Allium sp.* y *Prosopis sp.* mostrando una baja actividad citotóxica de dichos extractos. A diferencia de los extractos de *Musa sp.* que fue más toxico para esta línea celular.

Extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *Prosopis sp.*, *Allium sp.* y *Musa sp.* son capaces de reducir desde un 60% a un 100% la producción de focos infecciosos de rotavirus Wa sobre células MA-104 cuando se pre-incuba con el extracto antes de la infección.

Existe una correlación entre mayor sea la citotoxicidad del extracto con una mayor actividad antiviral.

El análisis molecular por RT-PCR demostró que los extractos *Prosopis sp.*, *Musa sp.* y *Allium sp.* inhiben la expresión de los genes de NSP2 y NSP5 en un rango de 74% hasta un 99% respectivamente a las 12 horas postinfección.

Concentraciones no citotóxicas (0.31 mg/ml) de los extractos de acuosos e hidro-etanólicos de *Musa sp.*, *Allium sp.* y *Prosopis sp.* generan un efecto pro-inflamatorio, induciendo la expresión de INF- β .

El extracto hidro-etanólico de *Musa sp.* (0.31 mg/ml) durante un periodo de 12 horas mantiene una expresión constante de IFN- β , lo que puede contribuir a regular la expresión del mismo durante una infección de rotavirus.

PERSPECTIVAS

Detectar los principales compuestos secundarios de los extractos de plantas como, taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas y terpenos.

Realizar fracciones a los extractos de plantas, y evaluar su actividad antiviral, además de realizar estudios para determinar si el efecto antiviral es observado debido a una interacción directa con alguna ruta metabólica de la célula hospedera y/o con la morfogénesis y mecanismos de rotavirus.

La defensa antiviral representada por la respuesta inmunológica innata y adaptativa comprende una interacción compleja entre las células infectadas y las células efectoras del hospedero. Las citocinas juegan un papel importante en diversas vías de señalización por lo cual se pretende evaluar un perfil de citocinas más amplio.

REFERENCIAS

- Andres et al. (2007). "Isoflavones at concentrations present in soy infant formula inhibit rotavirus infection in vitro." The Journal of nutrition **137**(9): 2068-2073.
- Angel, J., M. A. Franco, et al. (2007). "Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations." Nat Rev Microbiol **5**(7): 529-539.
- Arias CF, L. M., López S (1987). "Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity." J. Gen. Virol **68**.(633-642.).
- Ashraf, R., R. A. Khan, et al. (2011). "Garlic (*Allium sativum*) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients." Pakistan journal of pharmaceutical sciences(24): 565-570.
- Barro, M. and J. T. Patton (2007). "Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7." Journal of virology **81**(9): 4473-4481.
- Carreño-Torres, J. J., M. Gutiérrez, et al. (2010). "Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection." Virology journal **7**(1): 350.
- Cecílio, A. B., D. B. de Faria, et al. (2012). "Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus." J Ethnopharmacol **141**(3): 975-981.
- Cevenini, F. R., Raffaella Mazaracchio, Manuela Donati, lisabetta Falcieri, Israel Sarov. (1984). "A simple immunoperoxidase method for detecting enteric adenovirus and rotavirus in cell culture." Journal of Infection **8**(1): 22-24.
- Clark, B. and M. McKendrick (2004). "A review of viral gastroenteritis." Current opinion in infectious diseases **17**(5): 461-469.
- Cos, P., L. Maes, et al. (2004). "Plant Substances as Anti-HIV Agents Selected According to Their Putative Mechanism of Action." Journal of Natural Products **67**(2): 284-293.
- Cheung, A. H., J. H. Wong, et al. (2009). "Musa acuminata (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity." Phytomedicine **16**(6): 594-600.
- del Castillo MF, e. a. "Antivíricos y otros antimicrobianos." Enfermedades Infecciosas. **13**(192).
- Desselberger, U. (2014). "Rotaviruses." Virus Res **190**: 75-96.
- dos Santos, E. T., M. L. A. Pereira, et al. (2013). "Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion." International journal of molecular sciences **14**(4): 8496-8516.
- Eichwald, C., J. F. Rodriguez, et al. (2004). "Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation." Journal of General Virology **85**(3): 625-634.
- Elliott, E. J. (2007). "Acute gastroenteritis in children." BMJ **334**(7583): 35-40.
- Fensterl, V. and G. C. Sen (2009). "Interferons and viral infections." Biofactors **35**(1): 14-20.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (2001). Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins.
- Goncagul, G. and E. Ayaz (2010). "Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*)." Recent patents on anti-infective drug discovery **5**(1): 91-93.
- Henao, J. A., V. I. Bedoya, et al. (2012). "Inmunología e infección viral." Editorial Biogenesis: 81-98.
- Holloway, G. and B. S. Coulson (2013). "Innate cellular responses to rotavirus infection." Journal of General Virology **94**(Pt 6): 1151-1160.
- Hossain, M. S., M. B. Alam, et al. (2011). "Antidiarrheal, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the *Musa sapientum* Seed." Avicenna journal of medical biotechnology **3**(2): 95.
- Ian Cock, F. K. (2010). "A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts." Pharmacognosy Research **2**(4): 221-228.

- Jassim, S. and M. A. Naji (2003). "Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective." J Appl Microbiol **95**(3): 412-427.
- Karuppiyah, P. and M. Mustaffa (2013). "Antibacterial and antioxidant activities of Musa sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection." Asian Pacific journal of tropical biomedicine **3**(9): 737-742.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, et al. (2007). Inmunología de Kuby, McGraw-Hill.
- Lecoin, M. O. P. (2007). "Mecanismos de acción de compuestos antivirales aislados en plantas: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana como modelo." Vitae: Academia Biomédica Digital(31): 2.
- Lee, J.-B., S. Miyake, et al. (2012). "Anti-influenza A virus effects of fructan from Welsh onion (*Allium fistulosum* L.)." Food chemistry **134**(4): 2164-2168.
- Lee, J. S., Y.-N. Lee, et al. (2015). "Ginseng Protects Against Respiratory Syncytial Virus by Modulating Multiple Immune Cells and Inhibiting Viral Replication." Nutrients **7**(2): 1021-1036.
- Lee, M. H., D. J. Seo, et al. (2014). "Expression of antiviral cytokines in Crandell-Reese feline kidney cells pretreated with Korean red ginseng extract or ginsenosides." Food and Chemical Toxicology **70**: 19-25.
- López, S., C. Ayala-Breton, et al. (2008). "Biología molecular de rotavirus." Mensaje bioquímico XXXII.
- López, T., M. Rojas, et al. (2005). "Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication." Journal of General Virology **86**(6): 1609-1617.
- Luengo, T. L. (2007). "El ajo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas." Ámbito farmacéutico: Fitoterapia **26**(1).
- Mace, T. A., S. A. King, et al. (2014). "Bioactive compounds or metabolites from black raspberries modulate T lymphocyte proliferation, myeloid cell differentiation and Jak/STAT signaling." Cancer Immunology, Immunotherapy **63**(9): 889-900.
- Majewski, M. (2014). "Allium sativum: facts and myths regarding human health." Rocz Panstw Zakl Hig **65**(1): 1-8.
- Nidia Rojas, S. A. S., Armando Cuéllar Cuéllar (2010). "Plantas empleadas en medicina tradicional en Tierra Caliente, Guerrero, México, para el tratamiento de enfermedades infecciosas." Revista colombiana ciencia animal **2**: 124-136.
- Oh, D. Y., G. Gaedicke, et al. (2003). "Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity." Journal of medical virology **71**(1): 82-93.
- Palombo, E. A. (2006). "Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function." Phytotherapy Research **20**(9): 717-724.
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S. & Glass, R. I. (2006). "Rotavirus and severe childhood diarrhea." Emerg. Infect.Dis. **12**: 304–306.
- Paul Offit, H. F. C., William G. Stroop, E. Michael Twist, Stanley A. Plotkin, (1983). "The cultivation of human rotavirus, strain 'Wa', to high titer in cell culture and characterization of the viral structural polypeptides." Journal of Virological Methods **7**(1): 29-40.
- Penié, J. B., González-piñera, José Gundián Rodríguez, Miguel A, Rodríguez Alfonso, Pedro P, Pino. (1998). "Medicamentos antivirales." Acta Médica **8**(1): 86-100.
- Perez, S. I. O. R., Miguel. Sáez-Llorens, Xavier. Linhares, Alexandre C. Velázquez, FR. Colindres, Romulo E. Breuer, Thomas. Ortega-Barria, Eduardo. (2012). "Clinical development, registration, and introduction of human rotavirus vaccine: the Latin American experience." Trials in Vaccinology **1**: 10-20.
- Ramig, R. F. (2004). "Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection." JOURNAL OF VIROLOGY **78**(19): 10213–10220.
- Reséndez Velázquez, K. L. (2013). "ASPECTOS BIOLÓGICOS, ECOLÓGICOS Y USOS DEL MEZQUITE."

- Rodrigo Arreola, S. Q.-F., Rocío Ivette López-Roa, Enrique Octavio Flores-Gutiérrez, Juan Pablo Reyes-Grajeda, Lucrecia Carrera-Quintanar, and Daniel Ortuño-Sahagún. (2015). "Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Compounds." Journal of Immunology Research.
- Rollo, E. E., K. P. Kumar, et al. (1999). "The epithelial cell response to rotavirus infection." The Journal of Immunology **163**(8): 4442-4452.
- Rosenberg, Y. L. (2004). "Descripción de la actividad antiviral de Microcina J25 y Fragarina contra virus de importancia sanitaria."
- Sheth, R., J. Anderson, et al. (1996). "Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured epithelial cells." Virology **221**(2): 251-259.
- Singh, S. S., S. K. Devi, et al. (2014). "Banana Lectin: A Brief Review." Molecules **19**(11): 18817-18827.
- Stojanović, M. M. Ž., Irena P Petrušić, Vladimir Ž Kosec, Duško J Dimitrijević, Rajna D Jankov, Ratko M Dimitrijević, Ljiljana A Gavrović-Jankulović, Marija Đ (2010). "In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma." International immunopharmacology **10**(1): 120-129.
- T. Naji, M. H., and M. Asareh (2012). "Antibacterial effects of Prosopis juliflora occurring in Iran." Microbes in Applied Research: 204-208.
- Takahashi, K., M. Matsuda, et al. (2001). "Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana." Antiviral research **49**(1): 15-24.
- Tsai, Y., L. L. Cole, et al. (1985). "Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses." Planta medica= journal of medicinal plant research.
- Watson, C., D. Grando, et al. (2014). "The effects of oral garlic on vaginal candida colony counts: a randomised placebo controlled double-blind trial." BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology **121**(4): 498-506.